

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO DE AGRONOMIA TROPICAL

ALEX-SANDRA FARIAS DE ALMEIDA

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR FUNGOS  
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE GUARANAZEIRO E O SEU  
EFEITO CONTRA FITOPATÓGENOS**

Manaus, AM

2019

ALEX-SANDRA FARIAS DE ALMEIDA

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR FUNGOS  
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE GUARANAZEIRO E O SEU  
EFEITO CONTRA FITOPATÓGENOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Agronomia Tropical, área de concentração em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jânia Lília da Silva Bentes Lima

Coorientador: Prof. Dr. Ary Correa Junior

Manaus, AM

2019

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A447s Almeida, Alex-Sandra Farias de  
Síntese de nanopartículas de prata por fungos endofíticos  
isolados de guaranazeiro e o seu efeito contra fitopatógenos / Alex-  
Sandra Farias de Almeida. 2019  
110 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Jânia Lília da Silva Bentes Lima  
Coorientador: Ary Correa Junior  
Tese (Doutorado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal  
do Amazonas.

1. Nanotecnologia. 2. Síntese verde. 3. Crescimento micelial. 4.  
Controle biológico. I. Lima, Jânia Lília da Silva Bentes II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

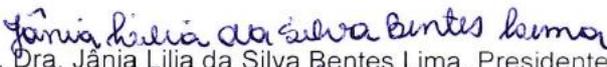
ALEX-SANDRA FARIAS DE ALMEIDA

SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA POR FUNGOS  
ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE GUARANAZEIRO E O EFEITO  
CONTRA FITOPATÓGENOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Agronomia Tropical da Universidade Federal do  
Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título  
de Doutora em Agronomia Tropical, área de concentração  
em Produção Vegetal.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2019

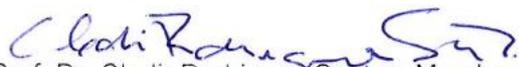
BANCA EXAMINADORA

  
Profa. Dra. Jânia Lilia da Silva Bentes Lima, Presidente  
Universidade Federal do Amazonas

  
Profa. Dra. Solange de Melo Vêras, Membro  
Universidade Federal do Amazonas

  
Prof. Dr. Luiz Antônio de Oliveira, Membro  
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

  
Dra. Maria Aparecida de Jesus, Membro  
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia

  
Prof. Dr. Cledir Rodrigues Santos, Membro  
Universidad de La Frontera - UFRO/Temuco - Chile

*Aos meus pais, Alex-Sandra Folhadela Farias e Sirney Rodrigues de Almeida.*

*Eu dedico!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar ao meu lado durante toda a minha caminhada e aos meus guias espirituais que me guiam e me fortalecem a cada dificuldade que a vida me apresenta.

Aos meus pais, Alex-Sandra Folhadela Farias e Sirney Rodrigues de Almeida, por serem indiscutivelmente os melhores pais que eu poderia ter, que acreditam em mim e me incentivam a cada novo desafio.

Aos meus avôs, Eladio Ribeiro Farias e Marithza Carneiro Folhadela, que mesmo não estando mais presentes no plano terrestre são partes fundamentais da minha vida e formação.

A CAPES, pelo financiamento de quatro anos de pesquisa através da bolsa de estudo.

A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup>. Dra. Jânia Lília da Silva Bentes Lima, pela confiança, dedicação, ensinamentos, carinho e apoio durante toda essa jornada.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Ary Correa Junior, pelo voto de confiança ao nosso trabalho e por toda assistência e orientação em Belo Horizonte.

Aos professores, Dr. Ferreira da Silva e Dra. Sônia Maria Figueiredo Albertino, pelos ensinamentos e sugestões apresentadas ao longo dessa jornada.

Ao professor, Dr. Luiz Orlando Ladeira, pelas críticas e pelo tempo colocado a minha disposição para ensinar enquanto estive na UFMG.

Ao secretário do programa, José Nascimento, pela preocupação em atender sempre de forma eficiente.

A Marcely Cristiny Andrade da Silva, por ter sido a responsável pelo início de tudo isso, me incentivando a fazer a seleção do doutorado e estando ao meu lado em todos os momentos, compartilhando alegrias, tristezas e cafés.

A Eugenio Renoir de Goes Borges, por ser mais que um companheiro, ser um amigo, alegrando meus dias nublados, compartilhando sonhos comigo e me ajudando a contar confidências (rs).

Aos meus amigos, Eliezer Litaiff, Fabíola Almeida e Priscila Souza, por serem muito mais que amigos, por estarem presente ao meu lado em dias de sol e principalmente em dias de chuva.

Ao Pai Henrique, por sempre está presente na minha vida com uma palavra amiga.

Aos amigos que fiz em Belo Horizonte, João Carlos, Paulo Fonseca, Lucas Vieira, Gustavo Freitas, Mauricio Junior, Marliete Carvalho, Miriã Souza, Anderson Nonato, Elúzia Peres, Ludmila Gouveia, Lorena Vivien, Rafael Bastos, Giovanna Rotondo, Rosângela Helena e Vivian Paixão, por todo companheirismo, carinho, sorrisos, cafés, abraços apertados e ensinamentos que dividiram comigo ao longo da minha estadia em BH e trabalho na UFMG, sem vocês os dias teriam sido em preto e branco.

Aos professores Dr Daniel Santos e Dra. Maria Aparecida, por me receberem junto com o professor Dr Ary Correa no laboratório de Micologia na UFMG.

A professora Dra. Maria Francisca Simas, e seus alunos, por todos os ensinamentos e atenção prestados durante parte do meu experimento.

As amigas que fiz durante a pós, que me mostraram que o carinho e a confiança pode existir em todos os lugares do mundo, Fabiana Rocha e Deolinda Garcia.

Aos colegas de pós que junto comigo dividiram a loucura que é essa vida de pós-graduação e juntos sobrevivemos, Fernando Gomes, Natasha Nina, Ana Suzette, Bruna Konrad, Karla Dutra, Francisco Pacheco, Jefferson Costa, Laís Gama, Silvana Pimentel, Raymundo Leite, Anselmo Santos e todos os demais que viveram essa trajetória comigo.

A Raquel Brandão, por me mostrar que determinação, empenho e responsabilidade não tem dia e nem tem hora, e que podemos criar grandes laços de amizade ao longo da nossa vida acadêmica.

A Ana Francisca Tiburcia, que chegou no final da minha caminhada no doutorado, mas me ajudou em todos os momentos em que precisei.

Aos meus colegas de laboratório pela convivência diária, risadas, cafés e ensinamentos compartilhados, Socorro Cristina, Ione Medeiros, Ana Galiceanu, Galileu, Geisa Crisostomo, Adriene, Alessandro Machado, Brunno Fernandes, Franczy Sousa, Victoria Xabregas, Adriana Simonetti.

A Loudiana Mosqueira, Érik Ávila e Tatiane Santos, por todo apoio, ensinamentos e assistência ao longo da minha pesquisa na UFMG.

As meninas da limpeza, Maria, Raquel, Eliana e todas as outras que contribuíram para manter nosso ambiente de trabalho limpo e organizado.

A cada uma das pessoas que se preocuparam, torceram e contribuíram para que eu conseguisse chegar ao fim dessa etapa, os meus sinceros agradecimentos.

*Eu sou descendente Zulú, sou um soldado de Ogum, devoto dessa imensa legião de Jorge, eu sincretizado na fé, sou carregado de axé, e protegido por um cavaleiro nobre.*

Zeca Pagodinho, Jorge Bem Jor

## RESUMO

A Nanotecnologia é a ciência que envolve a síntese e o processamento de materiais em escala nanométrica (1–100nm). Devido às suas propriedades únicas, a aplicação de nanopartículas metálicas em diferentes áreas tem se tornado cada vez mais notória. Entre as nanopartículas metálicas, as de prata são as mais amplamente reconhecidas por suas aplicações em áreas como agricultura, biotecnologia, medicina, entre outras. O uso de NPs na agricultura, representa uma importante inovação tecnológica, podendo ser utilizada na produção de nanofertilizantes, nanocidas ou pesticidas encapsulados em nanopartículas para liberação controlada. Este trabalho teve como objetivo estudar a síntese de nanopartículas de prata por fungos endofíticos obtidos de guaranazeiro e avaliar a atividade antifúngica das nanopartículas de prata no controle *in vitro* dos fitopatógenos *Colletotrichum guaranicola*, *Colletotrichum spp.* e *Corynespora cassiicola*. Neste trabalho, 90 isolados de fungos endofíticos foram utilizados para a produção de nanopartículas de prata. A caracterização das nanopartículas de prata foi realizada por espectroscopia de UV-Vis e microscopia eletrônica de varredura (MEV). Através da espectroscopia de UV-Vis foi possível determinar a presença de nanopartículas de prata em quatro soluções reacionais pela obtenção de bandas de absorção entre 400 a 500 nm. Através da avaliação do crescimento micelial e esporulação, foi observado que as nanopartículas sintetizadas apresentaram forte atividade antifúngica principalmente contra o fitopatógeno *Colletotrichum guaranicola*, sugerindo a possibilidade de utilização de nanopartículas de prata biossintetizadas no controle de fitopatógenos como uma alternativa no controle de doenças.

**Palavras-chave:** Nanotecnologia. Síntese verde. Crescimento micelial. Controle biológico.

## ABSTRACT

Nanotechnology is the science field that develops the synthesis and use of nanometer-scale materials (1-100 nm). Due to its unique properties, the application of metallic nanoparticles is becoming increasingly prevalent. Among metallic nanoparticles, silver nanoparticles are the most widely used in areas such as agriculture, biotechnology, medicine, and others. The use of nanoparticles in agriculture represents an important technological innovation for the production of nanofertilizers, nanoparticles or pesticides encapsulated in nanoparticles for controlled delivery. The objective of this work was to study the synthesis of silver nanoparticles by endophytic fungi obtained from guarana and to evaluate the antifungal activity of silver nanoparticles *in vitro* in controlling the phytopathogens: *Colletotrichum guaranicola*, *Colletotrichum* spp. and *Corynespora cassiicola*. In this study, 90 isolates of endophytic fungi were tested for the production of silver nanoparticles. The characterization of silver nanoparticles was performed by UV-vis spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM). Through the UV-Vis spectroscopy it was possible to determine the presence of silver nanoparticles in four reaction solutions by the observation of absorption bands in the 400 and 500 nm region. Through the evaluation of mycelial growth and sporulation, it was observed that synthesized nanoparticles presented strong antifungal activity mainly against the phytopathogen *C. guaranicola*, thus demonstrating the possibility of using biosynthesized silver nanoparticles in the control of phytopathogens, as an alternative for disease control.

**Keywords:** Nanotechnology. Green synthesis. Mycelial growth. Biological control.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Taça de Licurgo, avermelhado quando visto por transmissão (A) e aspecto esverdeado quando visto por reflexão (B).....	20
Figura 2 – Coluna de Cromatografia .....	47
Figura 3 – Síntese das nanopartículas de prata dos isolados <i>Fusarium concolor</i> que apresentaram máximo de absorção compatível com nanop prata. A = 0h, B = 72h, C = 144h e D = 216h após adição da solução de nitrato de prata (1 mM) .....	58
Figura 4 – Espectros UV-Vis dos isolados efetivos na produção de AgNPs .....	60
Figura 5 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das AgNPs do isolado 3013 R1. (B) Ajuste Gauss .....	61
Figura 6 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das AgNPs do isolado 3016 R3. (B) Ajuste Gauss .....	63
Figura 7 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das AgNPs do isolado 301 R1 (B) Ajuste Gauss .....	65
Figura 8 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das AgNPs do isolado 365 R2. (B) Ajuste Gauss .....	67
Figura 9 – Espectro de absorção no UV-Vis das AgNPs purificadas dos isolados 3013 R1 (A), 3016 R3 (B), 301 R1 (C), 365 R2 (D) .....	70
Figura 10 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das amostras Branco, AgNPs e alíquota purificada do isolado 3013 R1. (B) Ajuste Gauss da alíquota purificada .	73
Figura 11 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das amostras Branco, AgNPs e alíquota purificada do isolado 3016 R3. (B) Ajuste Gauss da alíquota purificada .	75
Figura 12 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das amostras Branco, AgNPs e alíquota purificada do isolado 301 R1. (B) Ajuste Gauss da alíquota purificada ...	77
Figura 13 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das amostras Branco, AgNPs e alíquota purificada do isolado 365 R2. (B) Ajuste Gauss da alíquota purificada ...	79
Figura 14 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura. A = 3013 R1, B = 3016 R3, C = 301 R1, D = 365 R2.....	81
Figura 15 – EDS realizado mostrando os elementos químicos presentes na solução reacional do isolado 301 R1 .....	82

Figura 16 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do isolado 301 R1. A = Solução reacional controle, B = Solução reacional com AgNPs. Setas brancas indicam nanopartículas de prata.....	83
Figura 17 – Crescimento micelial do fitopatógeno <i>C. guaranicola</i> (IO2). A – Testemunha; B – 1000 µL da solução reacional do isolado 3016 R3.....	85
Figura 18 – Crescimento micelial do fitopatógeno <i>Coletotrichum</i> spp. (I11). A – Testemunha; B – 1000 µL da solução reacional do isolado 301 R1 .....	85
Figura 19 – Crescimento micelial do fitopatógeno <i>C. cassicola</i> (T14-3). A – Testemunha; B – 1000 µL da solução reacional do isolado 3013 R1.....	86
Figura 20 – Esporulação do fitopatógeno <i>C. guaranicola</i> (IO2). A – Testemunha; B - 1000 µL da solução reacional do isolado 365 R2 .....	91
Figura 21 – Esporulação do fitopatógeno <i>C. guaranicola</i> (I11). A – Testemunha; B - 1000 µL da solução reacional do isolado 301 R1 .....	92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Isolados de fungos endofíticos de sementes e folhas de guaranazeiro avaliados para síntese de nanopartículas de prata.....	40
Tabela 2 – Média da leitura preliminar da absorvância do isolados de fungos endofíticos avaliados para síntese de nanopartículas de prata.....	54
Tabela 3 – Absorvância das alíquotas purificadas dos isolados fúngicos efetivos na produção de AgNPs .....	72
Tabela 4 – Dados referentes ao Gauss fit (regressão linear) dos espectros UV-Vis obtidos das amostras - OriginPro 8 .....	80
Tabela 5 – Média do diâmetro do crescimento micelial de fitopatógenos submetidos a diferentes doses de nanopartículas de prata.....	84
Tabela 6 – Crescimento radial diário – CRd e Percentual de inibição do crescimento micelial – PIC, expostos a diferentes doses de nanopartículas de prata.....	88
Tabela 7 – Porcentagem de inibição da esporulação (PIE) de fitopatógenos submetidos a diferentes doses de nanopartículas de prata.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ADE</b>	Água destilada esterilizada
<b>AgNPs</b>	Nanopartículas de prata
<b>BD</b>	Batata dextrose
<b>BDA</b>	Agar batata dextrose
<b>CR</b>	Crescimento radial
<b>CRd</b>	Crescimento radial diário
<b>EDS</b>	Espectroscopia de energia dispersiva
<b>FWHM</b>	Largura a meia altura
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>NPs</b>	Nanopartículas
<b>NPMs</b>	Nanopartículas metálicas
<b>NT</b>	Nanopartículas
<b>PIC</b>	Percentual de inibição do crescimento micelial
<b>PIE</b>	Percentual de inibição da esporulação
<b>pm</b>	picômetro
<b>SPR</b>	Ressonância de Plasmon de Superfície
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visível

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	17
2	OBJETIVOS .....	19
2.1	Objetivo Geral.....	19
2.2	Objetivos Específicos .....	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
3.1	Nanotecnologia.....	20
3.2	Nanopartículas .....	23
3.2.1	Nanopartículas metálicas.....	25
3.3	Síntese de nanopartículas.....	27
3.4	Biossíntese de nanopartículas por fungos .....	31
3.4.1	Fatores que afetam a síntese de nanopartículas .....	33
3.5	Aplicação da nanotecnologia no controle de doenças de plantas .....	34
3.6	Fungos endofíticos.....	36
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	38
4.1	Fungos endofíticos de guaranazeiro .....	38
4.2	Síntese de nanopartículas de prata (AgNPs).....	39
4.3	Purificação de nanopartículas de prata (AgNPs) .....	45
4.3.1	Preparação de solução tampão de citrato de sódio .....	46
4.3.2	Coluna de cromatografia.....	46
4.3.3	Purificação .....	47
4.4	Caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs).....	48
4.5	Obtenção dos isolados de fungos fitopatógenos .....	49
4.6	Avaliação da atividade antifúngica de nanopartículas de prata no controle <i>in vitro</i> dos fitopatógenos.....	50
4.7	Avaliação da atividade antifúngica de nanopartículas de prata na produção de esporos dos fitopatógenos.....	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
5.1	Síntese de nanopartículas de prata (AgNPs).....	53

5.2 Purificação de nanopartículas de prata (AgNPs) .....	68
5.3 Caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs).....	81
5.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	81
5.3.2 Análise EDS.....	82
5.4 Atividade antifúngica de nanopartículas de prata no controle <i>in vitro</i> dos fitopatógenos .....	84
5.5 Atividade antifúngica de nanopartículas de prata na produção de esporos dos fitopatógenos .....	90
6 CONCLUSÕES .....	93
REFERÊNCIAS .....	94
ANEXOS .....	110

## 1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia (NT) é um ramo da ciência, em rápido crescimento, que envolve síntese e processamento de materiais em nanoescala. Tem atraído atenção pelo impacto que os materiais nanoestruturados vêm causando na melhoria da qualidade de vida e na preservação do meio ambiente (FERREIRA; RANGEL, 2009; ABDELRAHIM et al., 2017).

Nanomateriais são estruturas que têm dimensões na escala do nanômetro (nm), ou seja, um bilionésimo ( $10^{-9}$ ) de um metro (AHMAD et al., 2003; AHMED et al. 2016). Em tais dimensões, estes materiais podem apresentar diferentes propriedades físicas, químicas e/ou biológicas, abrindo um leque de novas possibilidades para seu uso (SUDARENKOV, 2013).

As nanopartículas metálicas (NPMs) têm recebido atenção crescente, devido principalmente às suas propriedades físico-químicas únicas (VAHABI et al., 2011; KIRTH et al., 2012). Vários estudos têm demonstrado que nanopartículas metálicas, com destaque para as nanopartículas de prata, possuem uma ampla gama de aplicações, como agente antimicrobiano, detecção biomolecular, rotulagem biológica, catálise química, etc. (DEEPAK et al., 2011; DERBALAH et al., 2011; FRANCIS et al., 2017; ZHAO, et al., 2017; SIDDIQI, et al., 2018) (SIDDIQI; HUSEN, 2016). A evolução da nanotecnologia tem permitido aos pesquisadores incorporar o uso de substâncias coloidais com íons de prata em medidas preventivas e/ou de controle microbiano (DERBALAH et al, 2011).

As nanopartículas (NPs) são sintetizadas por meio de métodos físicos, químicos e biológicos. Métodos físicos e químicos requerem alto aporte energético, além de geralmente envolver substâncias tóxicas com geração de subprodutos perigosos. Métodos de síntese pela via biológica, normalmente mitigam estes problemas e o emprego de bactérias, fungos, e plantas, para este fim está bem reportado na literatura (RAI et al., 2009; VIJAYARAGHAVAN; NALINI, 2010; GOPINATH et al., 2012; HAMED I et al, 2017).

Nessas rotas de síntese, organismos biológicos ou parte deles, como biomoléculas, apresentam potencial redutor e, portanto, são utilizados para obtenção de NPs. A biossíntese de NPs é realizada tanto por organismos procaritos como eucariotos e é mediada por componentes biológicos capazes de reduzir o íon metálico, normalmente sem a geração de resíduos tóxicos e com pouco impacto ao meio ambiente (TAKKAR, 2010; IRAVANI, 2011; VAHABI et al. 2011; SUKIRTHA et al. 2012; MONDAL et al. 2014). Os sistemas biológicos são utilizados de forma eficiente tanto para a síntese intracelular como extracelular de diferentes nanopartículas metálicas (SINGH et al., 2015b).

Entre os sistemas microbianos, os fungos são mais utilizados devido sua maior distribuição na natureza e por desempenharem um papel crucial na síntese de nanopartículas metálicas (YADAV et al., 2015).

A síntese mediada por fungos possui algumas vantagens sobre a mediada por bactérias, porque síntese é principalmente extracelular tornando o processamento e manuseamento das nanopartículas de prata mais simples. Além disso os fungos geralmente possuem alta tolerância ao metal, capacidade de bioacumulação, e alta capacidade de absorção de metais intracelularmente (INGLE et al.; 2008; HEMATH et al., 2010).

O uso de NPs na agricultura, representa uma importante inovação tecnológica, sendo utilizados na produção de nanofertilizantes, nanocidas ou pesticidas encapsulados em nanopartículas para liberação controlada (FURLANETO, 2011), com consequente melhoria na produtividade e qualidade dos produtos.

Nesse contexto, devido ao fato de os fungos endofíticos fornecerem uma ampla variedade de metabólitos secundários bioativos com estruturas únicas que poderiam ser exploradas por sua capacidade de biossíntese de nanopartículas de prata para desenvolver um processo eficiente para o meio ambiente, este trabalho teve como objetivo estudar a síntese de nanopartículas de prata por fungos endofíticos obtidos de guaranazeiro e avaliar a atividade antifúngica das nanopartículas de prata no controle *in vitro* dos fitopatógenos *Colletotrichum guaranicola*, *Colletotrichum spp.* e *Corynespora cassiicola*. Visando contribuir com os estudos na área da nanotecnologia e avaliar o potencial de aplicação das NPs no controle de doenças de plantas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de biossíntese de nanopartículas de prata por fungos endofíticos isolados de folhas e sementes de guaranazeiro e a capacidade de inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*.

### 2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a capacidade de 90 isolados de fungos endofíticos de folhas e sementes de guaranazeiro como potencial biosistema para síntese de nanopartículas de prata;

Caracterizar as nanopartículas de prata produzidas utilizando as técnicas de Espectroscopia no UV-visível (UV-vis) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);

Avaliar a atividade antifúngica de nanopartículas de prata (AgNPs) produzidas por fungos endofíticos no controle *in vitro* dos fitopatógenos *Colletotrichum guaranicola*, *Colletotrichum* spp. e *Corynespora cassiicola*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Nanotecnologia

A nanotecnologia (NT) faz parte de um conjunto de revoluções técnicas que permearam a humanidade nas últimas décadas (LOPES, 2017). Consiste em uma área científica multidisciplinar que lida com a síntese, e manipulação de materiais ou estruturas que possuem ao menos uma dimensão na ordem de tamanho de 1 a 100 nanômetros (AHMAD et al., 2003; BIRLA, et al., 2009; HORISKOSHI; SERPONE, 2013; AHMED et al. 2016).

Estudos realizados em vestígios deixados pelos romanos, mostram que apesar da definição do termo nanotecnologia ser recente, nanomateriais já são aplicados desde a antiguidade. Em 1990 cientistas descobriram, utilizando um microscópio atômico de varredura, que a taça de Licurgo, datada do século V d.C., é composta por 66,2% de prata, 31,2% de ouro e 2,6% de cobre de até 100 nm em tamanho, incorporados em uma matriz de vidro (LOOS, 2014). O aparato possui propriedade de mudar de cor dependendo da luz incidente, quando visto por reflexão apresenta coloração esverdeada e quando visto por transmissão apresenta a coloração avermelhada (Figura 1) (SILVA, 2015a).

Figura 1 – Taça de Licurgo, avermelhado quando visto por transmissão (A) e aspecto esverdeado quando visto por reflexão (B)



Fonte: British museum, 2015

A composição do vidro que constitui esse cálice é semelhante aos dos vidros atuais, o que o difere e promove a propriedade de mudança de cor é a presença de nanopartículas de ouro e prata (FELDHEIM, 2002).

O ouro foi o metal de transição a compor a primeira solução coloidal obtida em 1856. O cientista Michel Faraday foi o autor dessa síntese antes mesmo do termo “nano” ser introduzido (FARADAY, 1857).

Foi o ganhador do prêmio Nobel de Química em 1925, Richard Zsigmondy, o primeiro a expressar o conceito nanômetro. Zsigmondy utilizou o termo nano para caracterizar partículas minúsculas e foi o pioneiro em medir, por meio de um microscópio, partículas de escala nanométrica (HULLA et al., 2015).

Em 1959, Richard Feynman ganhador do prêmio Nobel de Física em 1965, apresentou uma palestra intitulada “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, em que introduziu o conceito de manipulação de materiais a nível atômico, dando início ao desenvolvimento da nanotecnologia. Por essas razões, Feynman é considerado o pai da nanotecnologia moderna, ainda que o termo: nanotecnologia, ainda não fosse utilizado (HULLA et al., 2015).

Cerca de quinze anos após a palestra de Feynman, em 1974, o termo nanotecnologia foi criado pelo então professor da Universidade de Ciências de Tóquio, Norio Taniguchi (HULLA et al., 2015). Tanoguchi foi o primeiro a usar o termo nanotecnologia para descrever processos em semicondutores observados em escala nanométrica. Ele defendeu que nanotecnologia consistia no processamento, separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou molécula (RAI et al., 2009) e seu uso se intensificou a partir dos anos 80 com a invenção do microscópio de tunelamento desenvolvido pelos físicos Gerd Binnin e Heinrich Rohrer e do microscópio de força atômica. (FURLANETO, 2011; EGUCHI et al., 2013).

Em 1986, Kim Eric Drexler, do Instituto de Tecnologia de Massachusetts (EUA), publicou o livro intitulado “*Engines of Creation: The coming Era of Nanotechnology*”. Nesta obra, Drexler descreve a nanotecnologia como a nova tecnologia, com a qual, máquinas nanométricas poderiam manipular átomos. A construção de dispositivos manipulando átomo por átomo, em prol de aplicação útil, é um dos preceitos da nanotecnologia molecular de Drexler (DREXLER; SMALLEY, 2003).

O interesse nas possibilidades da ciência de nanoescala cresceu muito nas décadas de 80 e 90 quando se estabeleceu à chamada “era de ouro” da nanotecnologia, quando a “*American Chemical Society*” e a “*Royal Society of Chemistry*” lançaram periódicos específicos nessa área (SILVA, 2015b).

As descobertas da nanotecnologia despertaram interesse econômico e político modificando a forma como os diversos tipos de materiais são utilizados. Embora composto do mesmo elemento químico que as moléculas maiores, quando em escala nanométrica, os materiais apresentam comportamento muito distinto de suas conhecidas propriedades físicas e químicas, principalmente no que se refere a sua reatividade química, resistência mecânica, e comportamento sob ação da luz. Estas variações, tamanho dependente, modificam a natureza das interações das forças entre as moléculas do material, o que pode influenciar seu impacto sobre o ambiente, saúde humana e a sociedade (GARCIA, 2011).

Dentre as mais importantes aplicações da nanotecnologia estão os nanomateriais. Para serem classificados como tal, estes materiais, devem possuir pelo menos uma, de suas dimensões em escala nanométrica. Quando apenas uma dimensão é desta ordem e grandeza, tem-se os chamados filmes finos e camadas nanométricas. Para a condição de duas dimensões desta ordem, estão os nanotubos e nanofios. Para materiais com as três dimensões de ordem nanométrica estão as chamadas nanopartículas (AI et al., 2003). Estes tipos de partículas possuem inúmeras aplicações que podem torná-las ideais para várias aplicações, dentre elas o controle de doenças em humanos e plantas. (JO et al., 2012).

### 3.2 Nanopartículas

As nanopartículas podem ser conceituadas como coloides sólidos, estáveis, que possuem tamanho variando entre 10 a 1000 nm, definidas como partículas com dimensões menor que o micrometro ( $\mu\text{m}$ ) e maior que o picometro (pm) (SHIPWAY; WILLNER, 2001; KLABUNDE, 2001; DURAN et al., 2006; YEHIA; AL-SHEIKH, 2014; HUSAIN et al., 2015; ABDELGHANY et al., 2018).

Uma definição legítima – presente no Sistema Internacional de Unidade (SI) –, adotada pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO), esclarece que os limites de tamanho, para a utilização do prefixo nano, compreendem o intervalo de medidas da ordem de  $10^{-9}$ . Para o caso da unidade de comprimento, o metro, os limites são  $10^{-12} < \text{nm} < 10^{-6} \text{ m}$  (INMETRO, 2019).

Devido estas partículas possuírem dimensões desta ordem, elas possuem uma grande área superficial por unidade de volume, implicando num grande número de átomos na superfície e na camada mais próxima à superfície (EDER et al., 2009; VITTAL; ASWATHANARAYAN, 2011). Devido ao aumento da razão entre a área e o volume do nanomaterial, os efeitos de superfície se tornam mais importantes, conferindo a esses materiais características específicas para determinadas aplicações; por exemplo, um material magnético tal como o ferro pode não se comportar como um ímã ao ser preparado sob a forma de nanopartículas, com tamanho da ordem de 10 nm. Por outro lado, as nanopartículas esféricas de sílica presentes em um material, apesar de incolores, ao assumirem arranjos cristalinos bem empacotados podem difratar a luz visível tornando-se um material colorido (TOMA, 2004; TANSIL; GAO, 2006).

Nessa escala de tamanho, os materiais apresentam novas propriedades, antes não observadas quando em tamanho micro ou macroscópico, por exemplo, a tolerância à temperatura, a variedade de cores, as alterações da reatividade química e a condutividade elétrica (GALEMBECK; RIPPEL, 2004; CASTRO et al., 2014; CHAN; MAT DON, 2013).

A funcionalidade, uma das características mais importantes dos nanomateriais que permite sua extensa faixa de aplicações, é a sua capacidade de executar funções específicas. O termo funcionalização, comum em nanotecnologia, refere-se à execução de algumas funções químicas ou biológicas, através da projeção e manipulação desses materiais, de forma controlada e pré-determinada (TOMA, 2004). A funcionalização de nanopartículas de ouro com biopolímeros, por exemplo, é empregada na construção de biossensores para a detecção de ácidos nucleicos e proteínas (DANIEL; ASTRUC, 2004).

Muitos autores limitam o tamanho dos nanomateriais a 50 nm (KITTELSON, 2001), ou 100 nm (BORM et al., 2006). A escolha deste limite máximo é justificada pelo fato de algumas propriedades físicas de nanopartículas – como, por exemplo, sua grande área superficial por unidade de volume – terem seu efeito diminuído quando seus tamanhos ultrapassam tais dimensões.

As nanopartículas podem ser classificadas em dois grupos – orgânico (carbono) e inorgânico (não carbono). Nanopartículas orgânicas incluem NPs de carbono (fulerenos), e as nanopartículas inorgânicas incluem NPs magnéticas de metal nobre (como ouro e prata) e NPs semicondutoras (como o titânio dióxido de carbono e óxido de zinco). As NPs inorgânicas são de especial interesse por apresentarem propriedades superiores de material com ampla versatilidade funcional (KUMARI; SOBHA, 2013).

### 3.2.1 Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas possuem características próprias em comparação a partículas macroestruturadas, exemplo disso é a ampla disponibilidade, a alta funcionalidade, a biocompatibilidade, o menor tamanho e a maior superfície de reatividade, o que permite a interação com outras moléculas de interesse (PARVEEN et al., 2012; KUMARI; SOBHA, 2013).

As NPs têm gerado muito interesse em virtude de apresentarem propriedades físicas, químicas e biológicas únicas, em comparação a outras partículas (YANG et al., 2010). Estas possuem propriedades que dependem do tamanho, forma e morfologia, o que lhes permitem interagir com plantas, animais e microrganismos (SIDDIQI; HUSEN, 2016). Devido ao seu tamanho em nanoescala, a razão entre a área de superfície e o volume das NPs aumenta, fazendo com que elas se tornem mais reativas. Adicionalmente, podem surgir comportamentos eletrônicos e ópticos diferenciados, devido ao confinamento eletrônico, característica proeminente nas nanopartículas metálicas (NPMs) (ALBERNAZ, 2014).

As nanopartículas de metal exibem propriedades antimicrobiana devido à sua capacidade de interagir com as membranas celulares através da ruptura da estrutura da parede celular (AHMAD et al., 2013; TROP et al., 2006) e sua toxicidade depende tanto da dosagem quanto do tamanho das partículas (VERANO-BRAGA et al., 2014).

Essas propriedades únicas e a reatividade das NPs são dependentes de diversos fatores, entre eles: a composição química; a concentração e o estado de agregação; o tamanho, que está diretamente ligado à sua reatividade devido à razão volume-área de superfície; a forma, relacionada também com a área de superfície e com a condutividade da NP; e o recobrimento da NP, que vai moldar a sua interação com o meio externo (GRASSIAN, 2008; THAKKAR et al., 2010).

Particularmente, prata e ouro estão entre os metais mais estudados devido ao seu potencial uso em produtos médicos e cosméticos (SCHROFEL et al., 2014). As nanopartículas de prata (AgNPs) funcionam bem como compostos antimicrobianos, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (DEEPAK et al., 2011; DERBALAH et al., 2011; SIDDIQI, et al., 2018).

As nanopartículas de prata apresentam um intenso pico de absorção de radiação eletromagnética nos comprimentos de onda entre 400-670 nm devido à sua ressonância plasmônica de superfície (OLIVEIRA, 2005). Esse pico de absorção ocorre quando a frequência do campo magnético se torna ressonante com o movimento desses elétrons. Devido a esse fato, observa-se uma variação de cor característica em uma dispersão de AgNPs, de marrom avermelhado a marrom escuro, de acordo com o tamanho das NPs produzidas e com a composição do meio em que elas estão dispersas (ALBERNAZ, 2014).

A prata, desde os primórdios, vem chamando a atenção por suas diversas aplicações. Em escala nanométrica, a prata tem gerado interesse de pesquisadores de diferentes áreas desde o início da era da nanotecnologia. A prata é moldável e maleável, possui elevada condutividade térmica e elétrica, além de ser um oxidante forte. Nanopartículas de prata apresentam aplicações promissoras em diversos campos da ciência e tecnologia (VIJAYARAGHAVAN; NALINI, 2010; RAO et al., 2015).

As nanopartículas de prata são agregadas de átomos de prata que variam de diâmetro e apresentam diferenças em relação às propriedades da prata metálica. Estas possuem propriedades biológicas importantes. Alguns exemplos são a atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporoides*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* (KIM et al., 2009), *Rhizopus* sp., e *Aspergillus* sp. (MEDDA et al., 2015).

Diante das propriedades que as AgNPs apresentam é interessante entender o processo de sua síntese, como no caso do processo de síntese em fase líquida ou coloidal que apresentam reações químicas em solventes conduzindo à formação de coloides. Muitos dos solventes utilizados para formação desses coloides envolvem métodos físicos e químicos economicamente dispendiosos e extremamente laboriosos (VIJAYARAGHAVAN; NALINI, 2010; GOPINATH et al., 2012), incluindo produtos químicos tóxicos e principalmente solventes não-polares (MEDDA et al., 2015) prejudiciais ao meio ambiente (TAN et al., 2007). Portanto, é de interesse o desenvolvimento de métodos sustentáveis de produção de nanopartículas metálicas que não utilizem produtos químicos tóxicos para evitar efeitos adversos em sistemas biológicos (MORONES et al., 2005).

Os métodos que se aproximam desses princípios são incluídos numa classe cuja tecnologia utilizada para defini-la é conhecida de “síntese verde” (HUANG et al. 2007; VAHABI et al. 2011; SUKIRTHA et al. 2012; MONDAL et al. 2014).

### 3.3 Síntese de nanopartículas

Os métodos utilizados na preparação de nanopartículas metálicas e, nanomateriais em geral, podem ser agrupados em dois métodos distintos: “*Top-down*”, ou seja, de cima para baixo, ou “*Bottom-up*”, ou seja, de baixo para cima (HUSEN; SIDDIQI, 2014; SIDDIQI et al., 2018).

As sínteses físicas, ainda que menos comuns, envolvem geralmente o método *top-down*, no qual nanopartículas são produzidas a partir do mesmo material partindo de uma dimensão maior (BARROS, 2017; SIDDIQI et al., 2018). A partir do estado chamado de convencional, ou bruto, são introduzidos métodos físicos e mecânicos para alcançar o estado de nanomaterial (VERMA, et al., 2009). O método de ablação a laser, por exemplo, pode gerar nanopartículas monodispersas e estáveis (VALVERDE-ALVA et al., 2015).

A abordagem “cima para baixo” geralmente trabalha com o material em sua forma a granel, e a redução de tamanho para nanoescala é alcançada por técnicas especializadas, por exemplo, decomposição térmica, moagem mecânica, gravação, corte e deposição (SIDDIQI et al., 2018).

A síntese de nanopartículas metálicas também ocorre por métodos químicos e biológicos, conhecidos por receber, em sua grande maioria, a abordagem “*bottom-up*”. Isso significa manipular átomos e moléculas individualmente e agregá-los até os tamanhos adequados para cada nanomaterial de acordo com suas aplicações. Os métodos químicos e biológicos de produção de nanopartículas podem englobar reações eletroquímicas, além de, redução química com o uso de diferentes agentes e organismos biológicos (VON et al., 2011).

Os métodos químicos são mais comumente utilizados e reportados, sendo os mais adequados quando se deseja nanopartículas com um controle mais rigoroso de tamanho e forma (BASTUS et al. 2014). Neste tipo de síntese, uma fonte de íons prata (geralmente, nitrato de prata), é utilizada para gerar agregados de prata metálica após redução induzida por um agente redutor específico em solução. Agentes estabilizadores também são muito utilizados neste contexto para prover uma prolongação da estabilidade coloidal e para aumentar o controle sobre a forma geométrica das nanopartículas (MENG et al., 2010).

No entanto, devido à emergente necessidade de uma abordagem “verde” e sustentável na ciência, um maior foco tem sido empregado às sínteses biológicas ou biogênicas, que têm como fonte de agentes redutores e estabilizadores extratos de fungos (GADE et al., 2014; RODRIGUES et al., 2012), bactérias (GOU et al., 2015) ou plantas (AHMED et al., 2016).

Os protocolos de síntese de nanopartículas podem envolver combinações dos métodos físicos, químicos, fotoquímicos e biológicos (ZHANG et al., 2016; LOPES, 2017). Ainda assim, é importante o conhecimento acerca dos princípios básicos de cada um dos métodos de aquisição destas partículas.

Dentre os métodos físicos utilizados para a síntese de nanopartículas estão inclusos a decomposição térmica (YANG; AOKI, 2005), a irradiação a laser (ASLAN et al., 2006), condensação, difusão (PÉREZ-RODRÍGUEZ et al., 2006), descarga elétrica (ASHKARRAN et al., 2009), etc.

As vantagens dos métodos físicos são a velocidade, a radiação usada como agente redutor e não uso de substâncias químicas perigosas envolvidas. As desvantagens incluem o baixo rendimento e alto consumo de energia, contaminação por solventes e falta de distribuição uniforme (ABOU EL-NOUR, et al., 2010; ELSUPIKHE et al., 2015).

Os meios que envolvem o uso de produtos químicos para a produção de nanopartículas são os chamados métodos de síntese por via química. Estes, normalmente, são realizados por reação eletroquímica (SAU; ROGACH, 2010) ou redução química do material (BAI et al., 2015). Esse processo geralmente emprega três componentes principais: precursores de metais, agentes redutores e agentes de estabilização (ZHANG et al., 2016). Embora produzam AgNPs puras, usualmente utilizam produtos químicos tóxicos.

Os métodos fotoquímicos de preparação de nanopartículas utilizam a fotorredução de um precursor ou de íons de prata, no caso de preparação de nanopartículas de prata, com a utilização de intermediários ativados fotoquimicamente, por exemplo, um radical. As vantagens da utilização de métodos fotoquímicos são a preparação de AgNPs com elevada pureza, fácil processamento, ampla faixa de meios reacionais que podem ser utilizados (vidro, polímeros, micelas, emulsões, etc.) (PACIONI et al., 2015; GHORBANI et al., 2011).

Tanto os métodos físicos quanto os químicos são comumente agressivos ao meio ambiente, pois usam soluções e metodologias que usualmente geram resíduos tóxicos e demandam alto gasto de energia (RAI; YADAV, 2013).

O uso de produtos químicos tóxicos é ainda objeto de preocupação, pois esses produtos podem se depositar na superfície das nanopartículas. Deste modo, existe uma necessidade cada vez maior de desenvolver protocolos de síntese que sejam limpos, ou seja, não utilizam substâncias tóxicas e produzam nanopartículas biocompatíveis (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2010).

Ao longo da última década, houve um crescente interesse sobre o tema química “verde” em processos químicos (RAI, 2013). Esses esforços objetivam a eliminação total ou, pelo menos, a minimização do uso e da geração dos resíduos com a implementação de processos sustentáveis.

Doze princípios fundamentais, que regem a química verde, devem ser seguidos na implantação de processos sustentáveis:

- 1) Prevenção;
- 2) Economia de átomos;
- 3) Síntese de produtos menos perigosos.
- 4) Desenho de produtos seguros;
- 5) Solventes e auxiliares mais seguros;
- 6) Busca pela eficiência de energia;
- 7) Uso de fontes renováveis de matéria-prima;
- 8) Evitar a formação de derivados;
- 9) Catálise;
- 10) Desenho para a degradação
- 11) Análise em tempo real para a prevenção da poluição;
- 12) Química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes.

A síntese verde envolve três principais etapas, que devem ser avaliadas com base nas perspectivas da “química verde”:

- seleção do meio a ser utilizado como solvente;
- seleção de um agente redutor ecologicamente “correto”;
- seleção de substâncias não tóxicas que serão utilizadas na estabilização das AgNPs sintetizadas.

A síntese verde de nanopartículas é um grande avanço em relação a outros métodos. Esta, geralmente, envolve organismos não patológicos, não usa reagentes químicos incompatíveis com a vida, e pode produzir quantidades grandes de nanopartículas. Esta é uma técnica relativamente reprodutível e, na maioria dos casos, resulta em materiais mais estáveis (KALAIARASI et al., 2010).

Tal combinação de síntese de nanopartículas, pelo uso de organismos é chamada de síntese biológica. Os seres humanos, assim como outros organismos biológicos, são capazes de produzir e interagir com nanopartículas (BUZEA et al., 2007). Organismos biológicos como bactérias e fungos são muito utilizados na produção de nanopartículas graças a sua facilidade de cultivo (THAKKAR et al., 2010).

Aparentemente, a síntese de nanopartículas é uma resposta de defesa do microrganismo à toxicidade do material em seu estado de origem (KLAUS-JOERGER et al., 2001). Dado que, por exemplo, boa parte dos metais são tóxicos, eles devem ser reduzidos no interior da célula com a formação de complexos insolúveis em água, sendo assim, trata-se de um mecanismo desenvolvido para diminuir a toxicidade do metal.

A síntese biológica pode ser influenciada por fatores abióticos como: temperatura de cultivo, pH, substratos, osmolaridade, etc. Vários microrganismos são capazes de sintetizar as nanopartículas no meio intracelular, ou, no meio extracelular após excreção de enzimas redutoras; outros, ainda, podem realizar ambos os processos.

Sabe-se que organismos biológicos reagem de maneira diferente a íons metálicos e certos sais, e também existem diferentes biomoléculas responsáveis pela síntese de nanopartículas. Além disso, o mecanismo para síntese intra e extracelular é diferente em vários agentes biológicos (RAI; DURAN, 2011). Contudo, o mecanismo exato para a síntese de nanopartículas, utilizando agentes biológicos, ainda é pouco conhecido.

### 3.4 Biossíntese de nanopartículas por fungos

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos, constituídos por uma rígida parede celular. A parede celular fúngica é uma estrutura dinâmica que fornece células com resistência mecânica para suportar alterações na pressão osmótica e estresse ambiental (DURAN; NOMBELA, 2004; BOWNMAN; FREE 2011). Entre os agentes biológicos, fungos, são aproveitados para a síntese de nanopartículas de metal devido a sua alta tolerância a metais e capacidade de bioacumulação de metais (HEMATH et al., 2010).

Os fungos são fáceis de cultivar e devido à manipulação de sua biomassa ser simples são candidatos potenciais para a síntese de nanopartículas (CHAN; MASHITAH, 2012; HONARY et al., 2013). Os micélios fúngicos podem suportar a pressão de alta vazão, agitação e outras condições presentes em biorreatores o que não se observa para outros microrganismos e plantas (SONI; PRAKASH, 2012). Além disso, a viabilidade econômica de síntese em grande escala é obtida com uma pequena quantidade de biomassa (INGLE et al., 2008; VALA et al., 2014). Os fungos secretam uma grande quantidade de enzimas extracelulares necessárias para síntese e geram maior rendimento de nanopartículas por massa (ALANI et al., 2012; BIRLA et al., 2009; KUMAR et al., 2007; NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2010). Além disso, as NPs precipitadas para fora da célula são desprovidas dos componentes celulares e, portanto, podem ser usadas diretamente para diferentes aplicações (NARAYANAN; SAKTHIVEL, 2010).

Espécies como *Fusarium oxysporum* (DIAS et al., 2002; BANSAL et al., 2004) e *Aspergillus niger* (KUMAR et al., 2008) são relatadas como sintetizadoras de NPs de prata (AgNPs).

Segundo Shankar et al. (2003), a forma e o tamanho das NPs dependem do agente biológico envolvido, por exemplo, *Colletotrichum* sp. produz essencialmente NPs de ouro esféricas. O fungo da podridão branca, *Phanerochaete chrysosporium*, quando incubado com nitrato de prata em meio aquoso, forma AgNPs estáveis (VIGNESHWARAN, et al., 2006). O *Phoma coelomycetous* produziu extracelularmente uma variedade de AgNPs variando de 60 a 80 nm quando o filtrado da célula fúngica foi exposto a uma solução aquosa de nitrato de prata à temperatura ambiente (CHEN et al., 2003; BIRLA et al., 2009). Nanopartículas de prata foram produzidas pelo agente biológico *Trichoderma asperellum*, com um tamanho de 13 a 18 nm e morfologia bem definida e permanecendo estável durante vários meses (GAIKWAD et al., 2013).

Cinco espécies de *Trichoderma*: *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. pseudokoningii* e *T. virens*, foram selecionados para a produção de AgNPs. Estas NPs foram encontradas em formato único ou agregados, de um forma redonda e uniforme, com tamanhos de 8 a 60 nm (DEVI et al., 2013). O uso de agentes biológicos como os fungos levando à formação de NPs é uma estratégia moderna de biossíntese racional, sendo uma alternativa para os métodos físicos e químicos. Para a síntese de NPs a partir de fungos se tornar algo comercialmente viável, é essencial o desenvolvimento de métodos de baixo custo para o processo de separação das partículas das células fúngicas, tornando o processo de fabricação mais acessível (ALGHUTHAYMI et al., 2015).

### 3.4.1 Fatores que afetam a síntese de nanopartículas

Existem poucos relatos sobre os efeitos das condições da cultura na biossíntese de nanopartículas metálicas (INGLE, et al., 2008; SARAVANAN; NANDA, 2010). A biossíntese é diretamente afetada pelas condições de incubação, tais como temperatura, pH, tempo de incubação, natureza da composição da espécie ou do metal (KUMAR et al., 2008; SARAVANAN; NANDA, 2010; JAIN et al., 2011), concentração da biomassa dos fungos (KUMAR et al., 2008; SUNKAR; NACHIYAR, 2013) e condições de interação coloidal, que controla o tamanho, forma, localização e dispersão das NPs formadas. Os fatores como temperatura e pH podem ser manipulados para dar início a geometria de AgNPs (DURAN et al., 2005). Raliya e Tarafdar (2014) concluíram que uma concentração salina de  $0,1 \text{ mmol. L}^{-1}$ , 72h de incubação a pH 5,5 e temperatura de  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , resultaram em um maior rendimento de nanopartículas de zinco, de magnésio e de titânio usando fungos de solo.

### 3.5 Aplicação da nanotecnologia no controle de doenças de plantas

Fitopatologistas tem trabalhado na busca de métodos para controle de fitopatógenos de forma econômica e com impacto ao meio ambiente minorado. Nanomateriais estão sendo desenvolvidos para oferecerem a oportunidade de administrar pesticidas, herbicidas e fertilizantes mais eficientemente e com segurança, controlando quando e onde eles serão ativos (RAI; INGLE, 2012). Estudos tem confirmado que nanopartículas de metais são eficazes contra patógenos de plantas, insetos e pragas (CHOUDHURY et al., 2010).

O surgimento de nanociência e nanotecnologia na última década apresenta oportunidades para investigar os efeitos antimicrobianos de nanopartículas metálicas. As nanopartículas de metais tais como Ag e Cu são encontradas em muitas atividades antibacterianas e seu efeito tem sido atribuído ao pequeno tamanho e alta superfície em relação ao volume, que lhes permite interagir de perto com as membranas microbianas, e não apenas devido à liberação de íons metálicos em soluções (RAMYADEVI et al., 2012).

As propriedades das nanopartículas de metal encontram aplicações em vários campos, incluindo a medicina, farmacologia, monitoramento ambiental, eletrônica e na agricultura (NAVARRO et al., 2008).

As nanopartículas de prata apresentam amplo espectro de ação contra bactérias, especialmente as *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*; fungos, como *Candida albicans*; além de ser altamente eficazes como agentes antivirais (RAI, 2009).

Kim et al., (2009), avaliando o efeito antifúngico de nanopartículas de prata no controle *in vitro* de *Raffaelea* sp., observaram que o crescimento do fungo foi significativamente inibido em função da dose aplicada (0; 5; 10 e 25 ppm), de modo que quanto maior a dose menor foi o crescimento de hifas do fungo, observando ainda efeitos prejudiciais das nanopartículas de prata sobre a germinação dos conídios.

Kim et al., (2012), avaliaram o efeito antifúngico de três diferentes nanopartículas de prata em diferentes concentrações (10; 25; 50 e 100 ppm) no controle *in vitro* de dezoito espécies de fungos fitopatogênicos e observaram que a inibição total do crescimento da maioria dos patógenos foi observada na concentração de 100 ppm das nanopartículas, indicando que as taxas de inibição dependem da concentração das nanopartículas aplicada.

Singh et al., (2015a), testaram a eficácia de nanopartículas de prata sintetizadas a partir do fungo *Fusarium* sp. isolado de folhas saudáveis de *Withania somnifera* em diferentes concentrações (10, 20, 30, 40, 50 e 60 µL) no controle de patógenos bacterianos como *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *S. aureus*. A atividade antibacteriana de AgNPs contra os patógenos mostrou resultados encorajadores, mostrando uma zona de inibição de 26 mm, 26 mm e 28 mm, respectivamente, na concentração de 60 µL de AgNPs contra *E. coli*, *S. typhi* e *S. aureus*.

Rani e colaboradores (2017), sintetizaram nanopartículas de prata utilizando fungos endofíticos *Aspergillus terreus* isolados de *Calotropis procera* e avaliaram a atividade antibacteriana contra cepas bacterianas. As AgNPs sintetizadas mostraram atividade antibacteriana significativa contra *S. typhi*, *St. aureus* e *E. coli*. A concentração inibitória mínima foi na faixa de 11,43 µg/ml e 308 µg/ml.

### 3.6 Fungos endofíticos

A presença de microrganismos em partes aéreas de plantas, em geral, é associada a sintomas que promovem algum prejuízo ao tecido vegetal. Entretanto, a presença de fungos em tecidos aparentemente sem dano tem sido relatada em vários estudos. Tais microrganismos receberam a denominação de fungos endofíticos ou endófitos (WACULICZ-ANDRADE, 2009).

Bary (1866) introduziu o termo endófito, citado por Stone (1988), sendo aplicado à flora microbiana interna dos tecidos vegetais, em casos de infecções assintomáticas ou não, e nos casos de interações de antagonistas ou mutualistas. Carroll (1988), restringiu o uso do termo endofítico, aplicando somente para organismos que, em seu processo de colonização, não causam danos ao hospedeiro, desta forma excluindo os organismos patogênicos e mutualísticos.

A diferenciação entre endofíticos e fitopatogênicos depende do nicho ocupado em determinado estágio e da interação do microrganismo com o hospedeiro (STROBEL et al., 2004). A aplicação destes termos tem puro significado didático, havendo dificuldade em determinar limites entre eles (AZEVEDO et al., 2002). Alguns endófitos têm sido capazes de melhorar as habilidades competitivas para herbívoros, patógenos, e vários estresses abióticos para seus hospedeiros (SAIKKONEN et al., 1998; NEWTON et al., 2010; SAIKKONEN et al., 2010).

Os fungos endofíticos têm a capacidade de colonizar inter ou intracelular e estão localizados muitas vezes em um único tipo celular. A colonização de tecidos vegetais por endófitos envolve várias etapas, incluindo o reconhecimento, a germinação de esporos, a penetração da epiderme e a colonização dos tecidos (PETRINI, 1996; GAO et al., 2010).

Alguns fungos endofíticos são conhecidos por serem patógenos quiescentes (latentes) (HYDE; SOYTONG, 2008). Recentes observações e hipóteses sobre fungos endofíticos afirmam que a colonização assintomática é um equilíbrio de antagonismo entre o patógeno e o hospedeiro (DEVARAJU; SATISH, 2010).

Vários estudos têm demonstrado a importância de fungos endofíticos na indução de resistência de plantas (DINGLE; MCGEE, 2003; KAVROULAKIS et al., 2007), promoção do crescimento vegetal (HAMAYUN et al., 2009; YOU et al., 2012), maior tolerância ao estresse abiótico (KHAN et al., 2012), controle biológico de pragas e doenças (CAO et al., 2009; ZHANG et al., 2009) e a produção de metabólitos de interesse farmacológico, tais como antibióticos e antioxidantes (BUDHIRAJA et al., 2013; CHANDRA, 2012; RADÍĆ; STRUKELJ, 2012).

Os fungos endofíticos possuem grande diversidade e são de grande potencial para secretar metabólitos estruturalmente diversificados (BAKER; SATISH, 2012a; SINGH et al., 2015a; DEVI; JOSHI, 2015; RANI et al.; 2017). Contudo, existe um número de relatos limitados no campo dos endófitos e a sua capacidade para síntese de nanopartículas (BAKER; SATISH, 2012b; RANI et al.; 2017). A síntese de endófitos com nanopartículas é relativamente novo e espera-se ter um impacto significativo no futuro.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Fungos endofíticos de guaranazeiro

Os isolados de fungos endofíticos foram acessados do laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Estes isolados foram obtidos a partir de folhas e sementes coletadas em áreas de cultivo de guaranazeiro nos municípios de Manaus e Maués no Estado do Amazonas. O isolamento dos fungos endofíticos foi realizado pelo método indireto e preservados pelo método Castellani e por repicagens periódicas em tubos de ensaio contendo meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar).

Os isolados previamente preservados foram recuperados em placas de petri contendo meio cultura BDA, e posteriormente foram preparadas culturas monospóricas para todos os isolados, de forma a assegurar uniformidade genética. As culturas monospóricas foram obtidas retirando com alça de platina pequenas quantidades das estruturas do fungo e adicionadas em microtubos contendo 1000 µL de água destilada e esterilizada (ADE). Dessa diluição foram retirados 100 µL e adicionados em microtubos contendo 900 µL de ADE, os quais foram submetidos a diluições fracionadas até a concentração  $10^{-3}$ , onde foi retirado uma alíquota de 100 µL, e distribuído uniformemente em placas de Petri contendo o meio Ágar-Água, e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 27 °C durante 48 h. Após este período, as placas foram observadas sob lupa para a repicagem dos fragmentos de hifa originados a partir de um único conídio para novas placas contendo o meio BDA. Todos os isolados foram preservados em ADE em microtubos pelo método de Castellani (1967).

## **4.2 Síntese de nanopartículas de prata (AgNPs)**

A síntese das AgNPs foi realizada no Laboratório de Nanomateriais do Departamento de Física, e no Laboratório de Micologia do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e no Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Foi realizada uma seleção massal para selecionar os fungos com potencial para a síntese de nanopartículas de prata. Os inóculos fúngicos foram preparados a partir de 90 isolados endofíticos sendo 38 isolados de sementes e 52 isolados de folhas (Tabela 1) cultivados em placas de petri de 8 cm de diâmetro, contendo o meio de cultura BDA em temperatura de laboratório ( $\pm 26$  °C) durante sete dias.

Tabela 1 – Isolados de fungos endofíticos de sementes e folhas de guaranazeiro avaliados para síntese de nanopartículas de prata

<b>Fungo</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Isolado</b>
<i>Agaricales sp.</i>	BRS871	Semente	Maués	3012 R1
<i>Aspergillus flavus</i> Link	BRS300	Semente	Manaus	3051 R4
<i>A. flavus</i> Link	BRS300	Folha	Maués	849 R2
<i>A. pseudonomius</i> Varga, Samson & Frisvad	BRS300	Folha	Maués	762 R2
<i>A. sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	BRS871	Folha	Maués	421(B) R1
<i>A. sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	BRS871	Folha	Maués	491 R2
<i>A. sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	BRS300	Folha	Manaus	825 R3
<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	BRS300	Folha	Manaus	403(V) R1
<i>Bionectria sp. 1</i>	BRS871	Folha	Maués	437 R2
<i>Bionectria sp. 2</i>	BRS300	Folha	Manaus	505 R2
<i>Bionectria sp. 3</i>	BRS300	Semente	Maués	3001 R4
<i>Bionectria sp. 4</i>	BRS871	Folha	Maués	337 R2
<i>Bionectria sp. 5</i>	BRS871	Folha	Manaus	414 R1
<i>Bionectria sp. 6</i>	BRS871	Folha	Maués	437(1) R3
<i>Cladosporium halotolerans</i> Zalar, de Hoog & Gunde-Cim.	BRS871	Semente	Manaus	3042 R1
<i>Clonostachys rosea</i> (Preuss) Mussat	BRS300	Semente	Maués	3034 R1
<i>C. rosea</i> (Preuss) Mussat	BRS300	Semente	Maués	3034 R4
<i>C. rosea</i> (Preuss) Mussat	BRS300	Semente	Manaus	3041 R1
<i>C. rosea</i> (Preuss) Mussat	BRS300	Semente	Manaus	3044 R2
<i>C. rosea</i> (Preuss) Mussat	BRS300	Semente	Manaus	3048 R4
<i>C. rosea</i> (Preuss) Mussat	BRS300	Semente	Maués	3049 R2
<i>C. rosea</i> (Preuss) Mussat	BRS300	Folha	Manaus	384 R2
<i>Colletotrichum gigasporum</i> Rakotonir. & Munaut	BRS300	Folha	Maués	306 R1
<i>C. gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	BRS300	Semente	Maués	3028 R2

<i>C. gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	BRS300	Semente	Maués	3029 R4
<i>Daldinia</i> sp. 1	BRS300	Folha	Maués	408 R3
<i>Daldinia</i> sp. 2	BRS871	Folha	Manaus	511 R2
<i>Diaporthe citri</i> F.A. Wolf	BRS300	Folha	Manaus	342 R2
<i>D. phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc.	BRS300	Folha	Manaus	348 R3
<i>D. phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc.	BRS300	Folha	Manaus	351 R2
<i>D. phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc.	BRS300	Folha	Maués	361 R1
<i>D. phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc.	BRS871	Folha	Maués	393 R1
<i>D. phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc.	BRS300	Folha	Manaus	397 R2
<i>D. phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc.	BRS871	Folha	Manaus	479 R2
<i>Diaporthe</i> sp. 1	BRS300	Folha	Manaus	350 R1
<i>Diaporthe</i> sp. 2	BRS871	Folha	Maués	421 R2
<i>Diaporthe</i> sp. 3	BRS871	Folha	Maués	425 R3
<i>Fungal</i> sp.	BRS300	Folha	Manaus	422 R1
<i>Fusarium concolor</i> Reinking	BRS871	Semente	Manaus	3013 R1
<i>F. concolor</i> Reinking	BRS300	Semente	Manaus	3016 R3
<i>F. concolor</i> Reinking	BRS300	Semente	Manaus	3018 R1
<i>F. concolor</i> Reinking	BRS300	Folha	Maués	301 R1
<i>F. concolor</i> Reinking	BRS300	Folha	Maués	365 R2
<i>F. concolor</i> Reinking	BRS871	Folha	Maués	416 R3
<i>F. concolor</i> Reinking	BRS871	Folha	Maués	527 R1
<i>F. concolor</i> Reinking	BRS300	Folha	Maués	710 R5
<i>F. decemcellulare</i> Brick	BRS300	Semente	Manaus	3037 R4
<i>F. decemcellulare</i> Brick	BRS300	Folha	Manaus	349 R1
<i>F. polyphialidicum</i> Marasas, P.E. Nelson, Toussoun & P.S. van Wyk	BRS300	Semente	Maués	3023 R1
<i>F. polyphialidicum</i> Marasas, P.E. Nelson, Toussoun & P.S. van Wyk	BRS300	Folha	Manaus	482 R3
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.	BRS871	Folha	Maués	310(D) R1

<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.	BRS871	Folha	Maués	337(2) R3
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.	BRS871	Folha	Maués	396 R3
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.	BRS871	Folha	Maués	396(1) R2
<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.	BRS871	Folha	Manaus	594 R2
<i>Fusarium sp. 1</i>	BRS300	Semente	Manaus	3017 R1
<i>Fusarium sp. 2</i>	BRS300	Semente	Manaus	3019 R2
<i>Fusarium sp. 3</i>	BRS300	Semente	Maués	3022 R1
<i>Fusarium sp. 4</i>	BRS871	Semente	Maués	3027 R4
<i>Fusarium sp. 5</i>	BRS300	Semente	Manaus	3030(2) R1
<i>Fusarium sp. 6</i>	BRS300	Folha	Manaus	472 R2
<i>Fusarium sp. 7</i>	BRS300	Folha	Manaus	361 R2
<i>Hypoxylon monticulosum</i> Mont.	BRS300	Folha	Maués	302 R1
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon & Maublanc	BRS871	Folha	Maués	314 R4
<i>Lentinus swartzii</i> Berk.	BRS871	Semente	Maués	3007(1) R3
<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch	BRS300	Folha	Manaus	377 R1
<i>N. oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch	BRS871	Folha	Maués	440 R1
<i>N. oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch	BRS871	Folha	Maués	442 R1
<i>N. oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch	BRS300	Folha	Manaus	451 R1
<i>N. oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch	BRS871	Folha	Maués	461 R2
<i>Penicillium citrium</i> Thom	BRS871	Folha	Maués	435 R3
<i>P. citrium</i> Thom	BRS300	Folha	Manaus	484 R2
<i>P. citrium</i> Thom	BRS871	Folha	Maués	602(B) R2
<i>P. citrium</i> Thom	BRS300	Folha	Maués	776 R2
<i>P. citrium</i> Thom	BRS871	Folha	Manaus	840 R1
<i>Pestalotiopsis microspora</i> (Speg.) Bat. & Peres	BRS300	Semente	Maués	3002 R2
<i>P. microspora</i> (Speg.) Bat. & Peres	BRS871	Semente	Maués	3008 R4
<i>P. microspora</i> (Speg.) Bat. & Peres	BRS871	Folha	Maués	419 R3

<i>Phomopsis sp. 1</i>	BRS300	Semente	Maués	3031 R2
<i>Phomopsis sp. 2</i>	BRS300	Semente	Maués	3035 R3
<i>Phomopsis sp. 3</i>	BRS300	Semente	Manaus	3040 R3
<i>Phomopsis sp. 4</i>	BRS871	Semente	Manaus	3043 R1
<i>Polyporales sp. 5</i>	BRS871	Semente	Maués	3005 R2
<i>Polyporales sp. 6</i>	BRS871	Semente	Maués	3006 R1
<i>Polyporales sp. 7</i>	BRS871	Semente	Manaus	3015 R2
<i>Simplicillium lanosoniveum</i> (J.F.H. Beyma) Zare & W. Gams	BRS300	Semente	Maués	3000 R1
<i>S. lanosoniveum</i> (J.F.H. Beyma) Zare & W. Gams	BRS300	Semente	Maués	3024 R2
<i>Talaromyces amestolkiae</i> Yilmaz, Houbraken, Frisvad and Samson	BRS300	Semente	Maués	3052 R1
<i>T. amestolkiae</i> Yilmaz, Houbraken, Frisvad and Samson	BRS300	Semente	Maués	3053 R2
<i>T. amestolkiae</i> Yilmaz, Houbraken, Frisvad and Samson	BRS300	Semente	Manaus	3054 R4

Após o crescimento das colônias, os isolados foram cultivados em triplicata em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido BD (Batata-Dextrose), no qual foram depositados dez discos de cultura de 5 mm de diâmetro em cada frasco, e incubados em agitador orbital a 120 rpm na temperatura de laboratório ( $\pm 26^\circ\text{C}$ ) durante sete dias, (DURAN et al, 2005; 2012; GAJBHIYE et al, 2009; SANGUINEDO et al, 2018). O extrato metabólico foi separado da massa micelial por filtração em papel de filtro Whatman nº1 em seguida filtrado para esterilidade através de membrana  $0,22\ \mu\text{m}$  de porosidade. Em cada extrato metabólico recuperado foi adicionada uma solução 1mM de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) em um Erlenmeyer de 125 mL. A solução reacional foi mantida em agitador orbital a temperatura de laboratório no escuro a 120 rpm, durante nove dias (VAHABI et al, 2011; DEVI; JOSHI, 2015; SANGUINEDO et al, 2018).

A concentração final de  $\text{AgNO}_3$  de 1mM foi escolhida pois ao utilizar uma baixa concentração de sal precursor, a redução metálica ocorre de forma a favorecer o esgotamento dos cátions  $\text{Ag}^+$  livres em solução e a conversão deles à  $\text{Ag}^0$ , levando à formação das AgNPs.

Um estudo conduzido por Veerasamy et al., (2011) mostra que a formação de AgNPs por síntese verde utilizando diferentes concentrações finais de  $\text{AgNO}_3$  e, entre as concentrações finais testadas de 0,25; 0,5; 0,75; 1, 2 e 5 mM, a de 1mM apresentou maior formação de AgNPs de acordo com as máximas observadas por medidas de absorvância.

A redução de íons de prata foi monitorada por inspeção visual da solução bem como através de medidas de absorção através do espectro UV-Visível da solução por amostragem de alíquotas (1,5 mL) da solução reacional. As medidas de espectroscopia no UV-Vis foram registradas em um espectrofotômetro de duplo feixe (Shimadzu – modelo UV-1601 PC) operado a uma resolução de 1 nm entre 300 e 800 nm, em três momentos diferentes, com 72h, 144h e com 216h de incubação.

A agitação foi interrompida quando não havia aumento no pico máximo de absorção de nanopartículas de prata e simultaneamente foi observado a mudança da cor do filtrado incubado com a solução de prata 1mM, o que indica a bio-redução de íons de prata para nanopartículas. O extrato metabólico filtrado livre da solução de nitrato de prata foi usado como controle (VAHABI, et al, 2011; DEVI; JOSHI, 2015; SANGUINEDO et al, 2018).

### 4.3 Purificação de nanopartículas de prata (AgNPs)

A purificação da solução de nanopartículas de prata é uma etapa importante e necessária para remoção de quantidades substanciais de impurezas ou de agente redutor em excesso. Essa etapa também oferece maior flexibilidade de variação do volume final de amostra tratada das AgNPs em suspensão (BALASUBRAMANIAN et al., 2010).

Os métodos de purificação que têm sido mais adotados para remover componentes não desejados incluem centrifugação (WULANDARI et al., 2008), troca iônica (ZHANG et al., 2010), extração com solvente (SHALKEVICH et al., 2010), diálise (AQILI et al., 2008) e diafiltração (HABERT et al., 2006).

Para obter nanopartículas de prata (AgNPs) purificadas, uma alíquota de 1 mL foi retirada da solução reacional e adicionada a coluna de cromatografia de gel filtração.

A cromatografia de gel filtração, conhecida também como cromatografia de exclusão molecular, é uma técnica cromatográfica na qual as proteínas são separadas por meio de seus tamanhos e massas moleculares. Para este experimento, foi utilizada uma coluna composta por gel de Sephadex G-7, que apresenta pequenos poros, nos quais moléculas menores permearão, portanto, utilizarão maior tempo para percorrer a coluna e, assim, com maior volume para eluição, ao passo que as moléculas maiores terão menor tempo de eluição resultando na saída da coluna mais rapidamente (CAGLIARI, 2016).

A coluna utilizada foi composta por gel de Sephadex G-75 e o tampão utilizado foi o tampão de Citrato de Sódio (Ácido Cítrico + Citrato de Sódio) (YAO e LENHOFF, 2004).

#### 4.3.1 Preparação de solução tampão de citrato de sódio

Foi preparado 1L de solução aquosa de ácido cítrico e 1 L de solução aquosa de citrato de sódio; em um Erlenmeyer de 1L foi misturado 95 mL da solução aquosa de ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) com 415 mL da solução aquosa de citrato de sódio ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ ); sob agitação. Após confirmar o pH 6,0 da solução o volume da solução foi completado com água destilada.

#### 4.3.2 Coluna de cromatografia

Para a montagem da coluna de cromatografia foi preparado o gel a partir de 4g de Sephadex G-75 para 120 mL de solução tampão. Ambos foram misturados e deixados por 2h para intumescimento; após esse período o gel foi transferido para as colunas (Figura 2) e deixados em repouso por 24h para ocorrer o empacotamento do gel dentro da coluna.

Figura 2 – Coluna de Cromatografia



#### 4.3.3 Purificação

Uma alíquota de 1 mL foi retirada da solução reacional e adicionada a coluna de cromatografia. Em seguida a coluna foi lavada com 100 mL de solução tampão, e diversas alíquotas de 1,5 mL foram recolhidas e identificadas.

A espectroscopia UV-Vis foi utilizada para avaliar a estabilidade coloidal das nanopartículas purificadas, com o intuito de verificar a estabilidade nas nanopartículas de prata, que podem ser monitoradas ao longo da dissolução da alíquota de 1 mL adicionada na coluna.

Através da purificação em coluna de cromatografia, dez alíquotas de cada solução reacional foram recolhidas e avaliadas na espectroscopia UV-Vis afim de se ter uma alíquota livre de outros resíduos, e se obter uma alíquota com leitura de absorção entre 400 - 670 nm, o que segundo a literatura indica a presença de nanopartículas de prata.

#### 4.4 Caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs)

As mudanças de coloração das misturas de reação foram usadas como evidência para a formação de nanopartículas de prata. Amostras de 1,5 mL foram retiradas de frascos contendo a solução reacional já purificado, e o espectro de absorvância, foi medido na faixa de 300 - 800 nm. (SANGUÍNEDO et al, 2018).

A morfologia das AgNPs foi observada em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Este equipamento produz imagens baseadas na detecção de elétrons secundários gerados na amostra quando ela é bombardeada por um feixe de elétrons. Os elétrons são escaneados num plano e registrados em cada parte usando um detector (LIMBORÇO, 2018).

Para as imagens, 10 µL de cada solução reacional contendo as AgNPs obtidas a partir da purificação das soluções dos isolados endofíticos foram adicionados em um suporte (*stub*) revestido com uma fita de carbono e deixados por 72h a temperatura de laboratório ( $\pm 26$  °C) para secagem.

Todas as imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura FEG com sistema de Nanofabricação FIB com canhão de elétrons de emissão por efeito de campo, modelo – Quanta FEG 3D FEI.

O MEV permite visualizar a morfologia e, ao mesmo tempo, através do EDS (espectroscopia de energia dispersiva), avaliar a análise composicional e a conformação da presença de prata. Esse sistema de microanálise é constituído por espectrômetro de energia dispersiva de raios X. (DEVI; JOSHI, 2015; SANGUÍNEDO et al, 2018).

#### 4.5 Obtenção dos isolados de fungos fitopatógenos

Os isolados de fungos fitopatógenos *Colletotrichum guaranicola*, obtidos de plantas de guaranazeiro, *Colletotrichum spp.*, da pimenta-de cheiro (*Capsicum chinense* L) e *Corynespora cassiicola*, do tomateiro (*Solanum lycopersicon* L) foram acessados da coleção do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, onde foram realizados todos os ensaios *in vitro*. Os isolados estavam preservados em microtubos contendo água destilada esterilizada, mantidos em temperatura de laboratório ( $\pm 26$  °C).

A reativação dos isolados foi realizada em meio de cultura BDA Batata-Dextrose-Ágar, (batata, 200 g.L<sup>-1</sup>; dextrose, 20 g.L<sup>-1</sup>; ágar 17 g.L<sup>-1</sup>) em placa de Petri de 70 x 15 mm Ø, depositando um disco de meio de cultura contendo a colônia do isolado no centro de cada placa. Para o crescimento fúngico, as placas de Petri foram mantidas em temperatura ambiente com a presença de luz por sete dias. Preliminarmente foi realizado o teste de patogenicidade, confirmando a viabilidade patogênica dos isolados.

#### 4.6 Avaliação da atividade antifúngica de nanopartículas de prata no controle *in vitro* dos fitopatógenos

A atividade antifúngica das AgNPs foi avaliada utilizando as metodologias propostas por Bautista-Banões et al. (2003) e Guo et al. (2007).

Os experimentos foram conduzidos separadamente para cada fitopatógeno, em um delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos, quatro doses de NPs (0, 100; 500; 1000  $\mu\text{L}$ ), e cinco repetições.

Para verificar o efeito das AgNPs sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos, alíquotas de 0  $\mu\text{L}$ , 100 $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$  e 1000  $\mu\text{L}$  de cada solução reacional foram colocadas com o auxílio de uma pipeta automática, no centro de placas de Petri contendo o meio de cultura BDA, e distribuídas sobre a superfície do meio com o auxílio da alça de Drigalsky. Após duas horas, um disco de 0,5 cm de diâmetro do meio de cultura contendo o patógeno, foi repicado para o centro das placas de Petri, que foram mantidas em temperatura de laboratório ( $\pm 26\text{ }^\circ\text{C}$ ) durante o período necessário para que o crescimento colonial do patógeno de um dos tratamentos ocupasse toda a placa. A testemunha constitui o crescimento micelial do fungo em meio de cultura sem a presença das soluções em teste.

A avaliação da eficiência das nanopartículas de prata foi realizada diariamente por meio da medição, com o auxílio de um paquímetro digital, do diâmetro longitudinal e transversal do crescimento micelial do patógeno.

Após a obtenção do diâmetro colonial do patógeno foi realizado o cálculo do Crescimento Radial (CR) do fungo utilizando a fórmula proposta por Fortí (1997), em que:

$$CR = \frac{DM - 0,5}{2}$$

Onde:

DM: Média dos diâmetros longitudinal e transversal do crescimento colonial do patógeno;

0,5: Diâmetro do disco do isolado do patógeno colocado sobre o meio de cultura.

Em seguida, foi calculado o crescimento radial diário, usando a seguinte fórmula:

$$CRd = \frac{CR}{n}$$

Onde:

CR: Crescimento radial do fungo calculado utilizando a fórmula proposta por Fortí (1997);

n: Número de dias necessário para que o crescimento colonial do patógeno ocupe toda a placa de Petri.

Foi calculado o percentual de inibição do crescimento micelial (PIC) conforme a fórmula utilizada por Hillen et al. (2012), em que:

$$PIC = \frac{(\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento do tratamento}) \times 100}{\text{Crescimento da testemunha}}$$

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, usando o programa para análise estatística ASSISTAT versão 7.7.

#### **4.7 Avaliação da atividade antifúngica de nanopartículas de prata na produção de esporos dos fitopatógenos**

Foram coletados os esporos das placas nas quais se avaliou o crescimento micelial. Adicionou-se 20 mL de água destilada esterilizada às placas de Petri com pincel de cerdas macias os conídios foram removidos. A suspensão de todas as placas de cada tratamento foi coletada em um béquer e o número de esporos foi quantificado em câmara de Neubauer.

Uma alíquota de 10 µL, da solução de esporos foi transferida para a Câmara. Para isso a ponta da pipeta foi colocada no canal em um dos lados e o fluido foi forçado a sair, permitindo assim que entrasse na câmara por capilaridade. A seguir a câmara foi colocada sob microscópio (objetiva de 40x) onde foi realizado a contagem dos esporos. Foram contados todos os esporos que estavam dentro da área do quadrado grande central, incluindo aqueles que estavam sobre as linhas superior e direita do perímetro externo do quadrado médio. Os esporos que estavam sobre as linhas inferior e esquerda deste quadrado não foram incluídos na contagem (VICCINI, 2004).

Foi calculado o percentual de inibição da esporulação (PIE) conforme a fórmula utilizada por Fernandes et al., (2015), em que:

$$PIE = \frac{(Esporulação da testemunha - Esporulação do tratamento) \times 100}{Esporulação da testemunha}$$

Os dados obtidos da contagem dos esporos foram submetidos à análise estatística e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, usando o programa para análise estatística ASSISTAT versão 7.7.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Síntese de nanopartículas de prata (AgNPs)

Os 90 isolados fúngicos obtidos de sementes e folhas de guaranazeiro foram cultivados em triplicata em meio BD (Batata-Dextrose) para a obtenção de filtrados fúngicos que foram empregados na avaliação da capacidade de conversão de nanopartículas de prata. Dentre os 90 isolados avaliados, quatro (3013 R1) *Fusarium concolor*; (3016 R3) *Fusarium concolor*; (301 R1) *Fusarium concolor*; (365 R2) *Fusarium concolor* apresentaram máximo de absorção variando de 400 a 500 nm de acordo com a leitura preliminar de absorbância (Tabela 2).

Tabela 2 – Média da leitura preliminar da absorbância do isolados de fungos endofíticos avaliados para síntese de nanopartículas de prata

<b>Isolado</b>	<b>Espécie</b>	<b>Pico de absorbância (nm)</b>
<b>3012 R1</b>	<i>Agaricales sp.</i>	265
<b>3051 R4</b>	<i>Aspergillus flavus</i> Link	350
<b>849 R2</b>	<i>A. flavus</i> Link	300
<b>762 R2</b>	<i>A. pseudonomius</i> Varga, Samson & Frisvad	340
<b>421(B) R1</b>	<i>A. sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	280
<b>491 R2</b>	<i>A. sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	210
<b>825 R3</b>	<i>A. sydowii</i> (Bainier & Sartory) Thom & Church	270
<b>403(V) R1</b>	<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	260
<b>437 R2</b>	<i>Bionectria sp. 1</i>	215
<b>505 R2</b>	<i>Bionectria sp. 2</i>	210
<b>3001 R4</b>	<i>Bionectria sp. 3</i>	260
<b>337 R2</b>	<i>Bionectria sp. 4</i>	370
<b>414 R1</b>	<i>Bionectria sp. 5</i>	290
<b>437(1) R3</b>	<i>Bionectria sp. 6</i>	220
<b>3042 R1</b>	<i>Cladosporium halotolerans</i> Zalar, de Hoog & Gunde-Cim.	230
<b>3034 R1</b>	<i>Clonostachys rosea</i> (Preuss) Mussat	225
<b>3034 R4</b>	<i>C. rosea</i> (Preuss) Mussat	230
<b>3041 R1</b>	<i>C. rosea</i> (Preuss) Mussat	330
<b>3044 R2</b>	<i>C. rosea</i> (Preuss) Mussat	350
<b>3048 R4</b>	<i>C. rosea</i> (Preuss) Mussat	300
<b>3049 R2</b>	<i>C. rosea</i> (Preuss) Mussat	310
<b>384 R2</b>	<i>C. rosea</i> (Preuss) Mussat	240

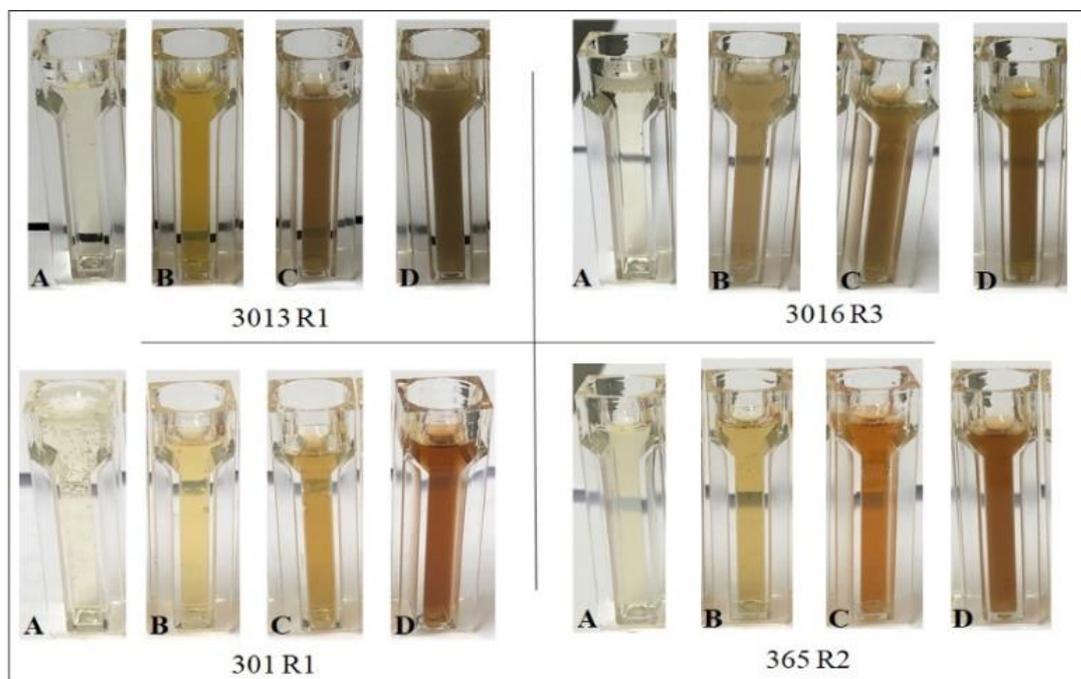
<b>306 R1</b>	<i>Colletotrichum gigasporum</i> Rakotonir. & Munaut	230
<b>3028 R2</b>	<i>C. gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	270
<b>3029 R4</b>	<i>C. gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	230
<b>408 R3</b>	<i>Daldinia</i> sp. 1	310
<b>511 R2</b>	<i>Daldinia</i> sp. 2	265
<b>342 R2</b>	<i>Diaporthe citri</i> F.A. Wolf	210
<b>348 R3</b>	<i>D. phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc.	310
<b>351 R2</b>	<i>D. phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc.	240
<b>361 R1</b>	<i>D. phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc.	220
<b>393 R1</b>	<i>D. phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc.	275
<b>397 R2</b>	<i>D. phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc.	250
<b>479 R2</b>	<i>D. phaseolorum</i> (Cooke & Ellis) Sacc.	210
<b>350 R1</b>	<i>Diaporthe</i> sp. 1	305
<b>421 R2</b>	<i>Diaporthe</i> sp. 2	260
<b>425 R3</b>	<i>Diaporthe</i> sp. 3	255
<b>422 R1</b>	<i>Fungal</i> sp.	280
<b>301 R1</b>	<i>Fusarium concolor</i> Reinking	430
<b>3013 R1</b>	<i>F. concolor</i> Reinking	440
<b>3016 R3</b>	<i>F. concolor</i> Reinking	445
<b>3018 R1</b>	<i>F. concolor</i> Reinking	215
<b>365 R2</b>	<i>F. concolor</i> Reinking	450
<b>416 R3</b>	<i>F. concolor</i> Reinking	230
<b>527 R1</b>	<i>F. concolor</i> Reinking	380
<b>710 R5</b>	<i>F. concolor</i> Reinking	230
<b>3037 R4</b>	<i>F. decemcellulare</i> Brick	295
<b>349 R1</b>	<i>F. decemcellulare</i> Brick	205
<b>361 R2</b>	<i>F. polyphialidicum</i> Marasas, P.E. Nelson, Toussoun & P.S. van Wyk	235

<b>3023 R1</b>	<i>F. polyphialidicum</i> Marasas, P.E. Nelson, Toussoun & P.S. van Wyk	250
<b>482 R3</b>	<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.	230
<b>310(D) R1</b>	<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.	215
<b>337(2) R3</b>	<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.	220
<b>396 R3</b>	<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.	270
<b>396(1) R2</b>	<i>F. solani</i> (Mart.) Sacc.	255
<b>594 R2</b>	<i>Fusarium</i> sp. 1	215
<b>3017 R1</b>	<i>Fusarium</i> sp. 2	250
<b>3019 R2</b>	<i>Fusarium</i> sp. 3	265
<b>3022 R1</b>	<i>Fusarium</i> sp. 4	220
<b>3027 R4</b>	<i>Fusarium</i> sp. 5	230
<b>3030(2) R1</b>	<i>Fusarium</i> sp. 6	255
<b>472 R2</b>	<i>Fusarium</i> sp. 7	260
<b>302 R1</b>	<i>Hypoxyton monticulosum</i> Mont.	310
<b>314 R4</b>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon & Maublanc	285
<b>3007(1) R3</b>	<i>Lentinus swartzii</i> Berk.	295
<b>377 R1</b>	<i>Nigrospora oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch	255
<b>440 R1</b>	<i>N. oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch	230
<b>442 R1</b>	<i>N. oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch	260
<b>451 R1</b>	<i>N. oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch	220
<b>461 R2</b>	<i>N. oryzae</i> (Berk. & Broome) Petch	210
<b>435 R3</b>	<i>Penicillium citrium</i> Thom	275
<b>484 R2</b>	<i>P. citrium</i> Thom	370
<b>602(B) R2</b>	<i>P. citrium</i> Thom	245
<b>776 R2</b>	<i>P. citrium</i> Thom	310
<b>840 R1</b>	<i>P. citrium</i> Thom	230
<b>3002 R2</b>	<i>Pestalotiopsis microspora</i> (Speg.) Bat. & Peres	230

<b>3008 R4</b>	<i>P. microspora</i> (Speg.) Bat. & Peres	265
<b>419 R3</b>	<i>P. microspora</i> (Speg.) Bat. & Peres	265
<b>3031 R2</b>	<i>Phomopsis</i> sp. 1	280
<b>3035 R3</b>	<i>Phomopsis</i> sp. 2	260
<b>3040 R3</b>	<i>Phomopsis</i> sp. 3	285
<b>3043 R1</b>	<i>Phomopsis</i> sp. 4	245
<b>3005 R2</b>	<i>Polyporales</i> sp. 5	215
<b>3006 R1</b>	<i>Polyporales</i> sp. 6	275
<b>3015 R2</b>	<i>Polyporales</i> sp. 7	260
<b>3000 R1</b>	<i>Simplicillium lanosoniveum</i> (J.F.H. Beyma) Zare & W. Gams	235
<b>3024 R2</b>	<i>S. lanosoniveum</i> (J.F.H. Beyma) Zare & W. Gams	230
<b>3052 R1</b>	<i>Talaromyces amestolkiae</i> Yilmaz, Houbraken, Frisvad and Samson	230
<b>3053 R2</b>	<i>T. amestolkiae</i> Yilmaz, Houbraken, Frisvad and Samson	255
<b>3054 R4</b>	<i>T. amestolkiae</i> Yilmaz, Houbraken, Frisvad and Samson	225

Após a exposição do meio BD ao nitrato de prata, foi observado mudança de cor, a qual é dependente do tempo como ilustrado na Figura 3.

Figura 3 – Síntese das nanopartículas de prata dos isolados *Fusarium concolor* que apresentaram máximo de absorção compatível com nanoprata. A = 0h, B = 72h, C = 144h e D = 216h após adição da solução de nitrato de prata (1 mM)



No início da reação (tubo A = tempo zero) a solução apresenta cor amarelo transparente típico do meio BD. Após 72h (tubo B) a solução começa a apresentar uma variação na cor, o que indica que está ocorrendo uma modificação da composição da solução.

Com 144h (tubo C) a solução apresentou uma cor marrom-amarelada, uma indicação de redução do cátion prata a prata metálica ( $\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$ ). Segundo Solomon et al., (2007), indica a síntese de AgNPs com crescimento controlado.

Com o aumento do tempo de reação (tubo D = 216h) a solução apresentou cor marrom que é característica da formação de nanopartículas de prata a partir de uma aglomeração produzidas devido à excitação plasmônica de superfície e redução de  $\text{AgNO}_3$ .

Segundo Link e El-Sayed (2003), a dispersão das nanopartículas manifesta esta cor devido à absorção de fótons associados à ressonância de plasma. A origem física da forte absorção de luz por nanopartículas de metais nobres é a oscilação de elétrons induzida por interação com o campo eletromagnético. O campo elétrico de uma onda induz a polarização dos elétrons em relação ao núcleo iônico da nanopartícula esférica, criando uma diferença de carga na superfície da nanopartícula. Desta forma, uma oscilação dipolar de todos os elétrons com a mesma fase é produzida. Quando a frequência do campo eletromagnético se torna ressonante com o movimento dos elétrons, uma forte absorção dos elétrons é vista que origina a cor observada.

Birla et al., (2009) utilizando o meio BD para a produção de AgNPs com o fungo *Ph. glomerata*, visualizaram a mudança de coloração de amarelo transparente para o marrom, assim como Vahabi et al., (2011), utilizando o meio GC (glicose e hidrolisado de caseína) para a produção de AgNPs com o fungo *Trichoderma reesei*, relataram a mudança de coloração de amarelo transparente para uma cor marrom-amarelada após 72h de incubação, indicando a formação de nanopartículas de prata na mistura.

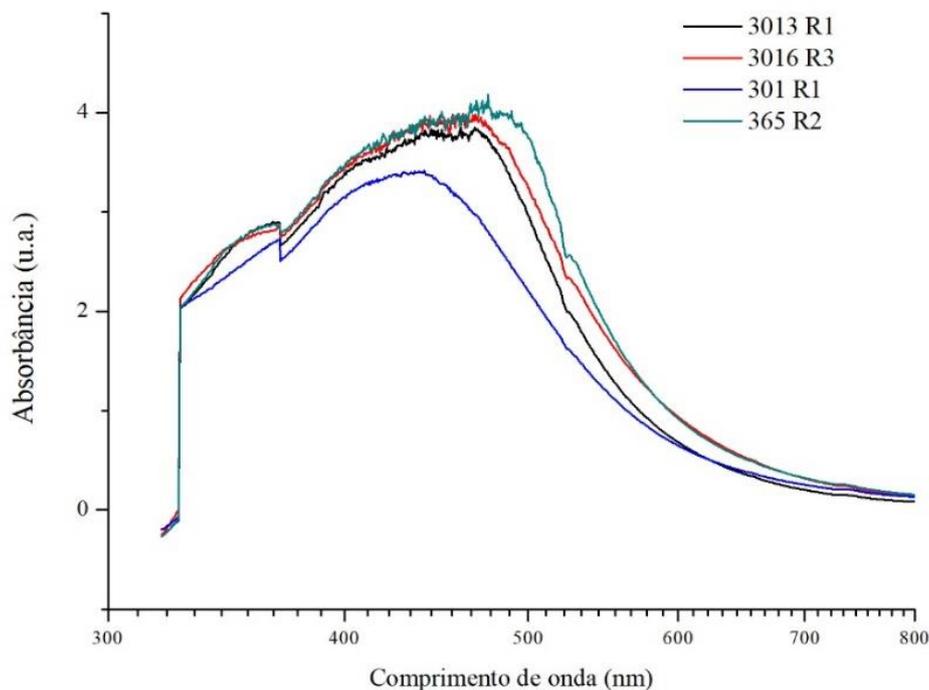
Durante a biossíntese de nanopartículas, o tipo de microrganismo, o meio de cultura e as condições de incubação são importantes fatores para o controle dos parâmetros desejados (HUSSEINY et al., 2015). As condições ambientais afetam o crescimento e metabolismo dos fungos, afetando diretamente a produtividade do processo. A otimização física de parâmetros não só contribuirá para um bom crescimento, mas também para aumentar o rendimento do produto. As condições de crescimento, tais como concentração de substrato, pH, temperatura e inóculo afetam diretamente a taxa de atividade enzimática que reflete na síntese de AgNPs (SINGH et al., 2014).

A mudança na coloração da solução é a primeira evidência da formação das AgNPs, que se confirma através da espectroscopia UV-Vis, como ilustrado na Figura 6.

O perfil de absorção de luz foi obtido a partir de uma varredura de 300 a 800 nanômetros (nm), pois tem se conhecimento que a prata em escala nanométrica tem o seu máximo de absorção variando de 400 a 670 nm (OLIVEIRA, 2005). Os isolados que apresentaram mudança de coloração, apresentaram a banda *plasmonica* característica de NPs de prata, sendo este o primeiro indício de que a prata formada em todas as amostras está na forma nanoparticulada.

Os espectros abaixo, Figura 4, são referentes às amostras dos isolados fúngicos efetivos na produção de AgNPs. Amostras das soluções reacionais dos isolados *F. concolor* (3013 R1, 3016 R3, 301 R1 e 365 R2), tendo a concentração de nitrato de prata na sua composição.

Figura 4 – Espectros UV-Vis dos isolados efetivos na produção de AgNPs

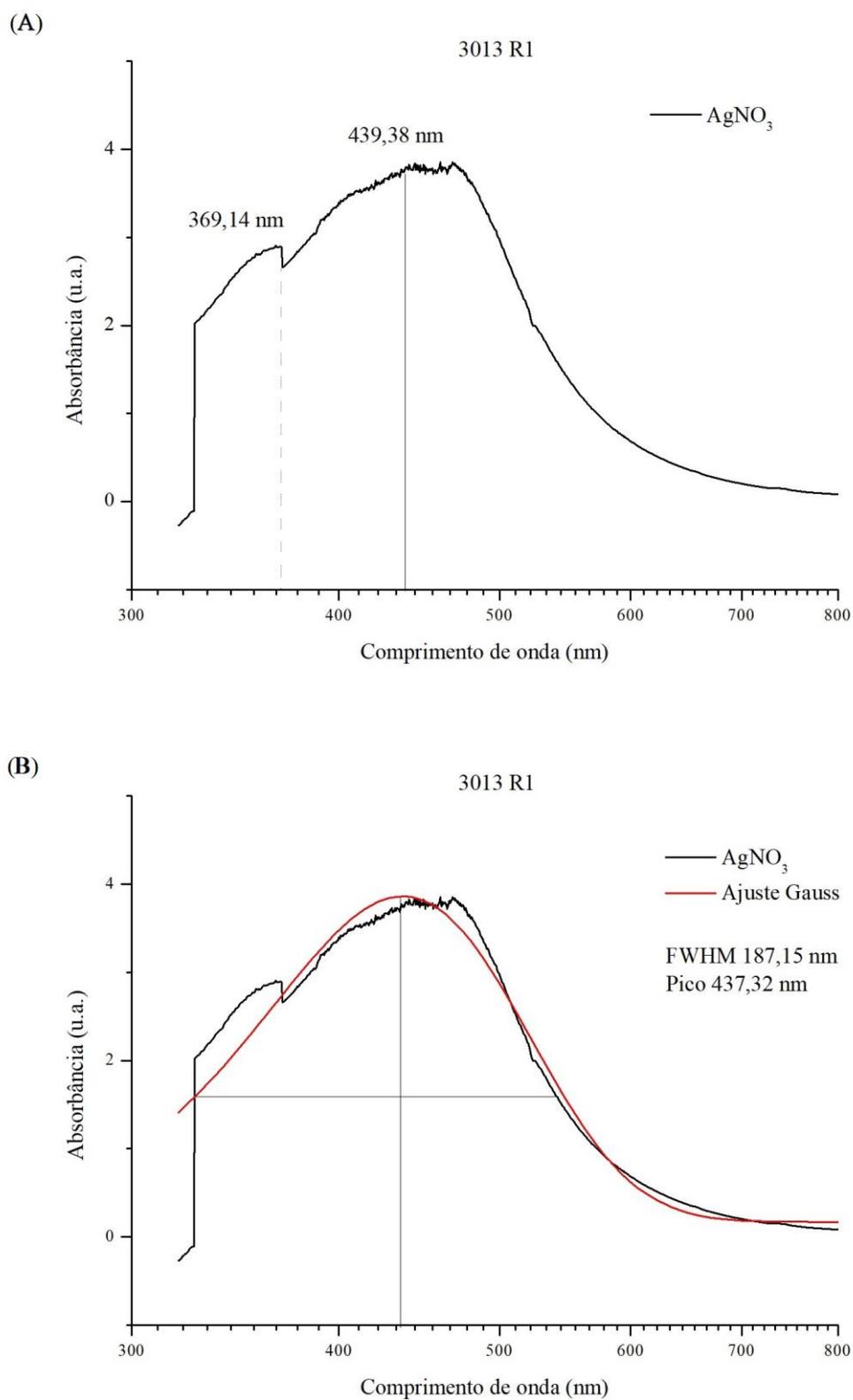


É observado bandas de *plasmon* de superfície na região entre 350 e 500 nm, caracterizando a existência de NPs de prata em sua superfície. Após uma regressão da curva, gaussiana, obteve-se os máximos de absorção e a largura a meia altura da banda (Full Width at Half Maximum – FWHM).

No espectro representativo da absorção de luz referente ao isolado 3013 R1 é observado que o máximo de absorção está em, aproximadamente 439,38 nm. Na região próxima a 369 nm, os valores de absorbância estão em torno 2,8, contudo esses valores começam a aumentar na região de 440 nm e chegam ao máximo de absorção na região de 468 nm (Figura 5A).

A gaussiana do espectro referente a este isolado fúngico (Figura 5B), está em, aproximadamente, 437,32 nm e a largura a meia altura da banda é de aproximadamente 187,15 nm.

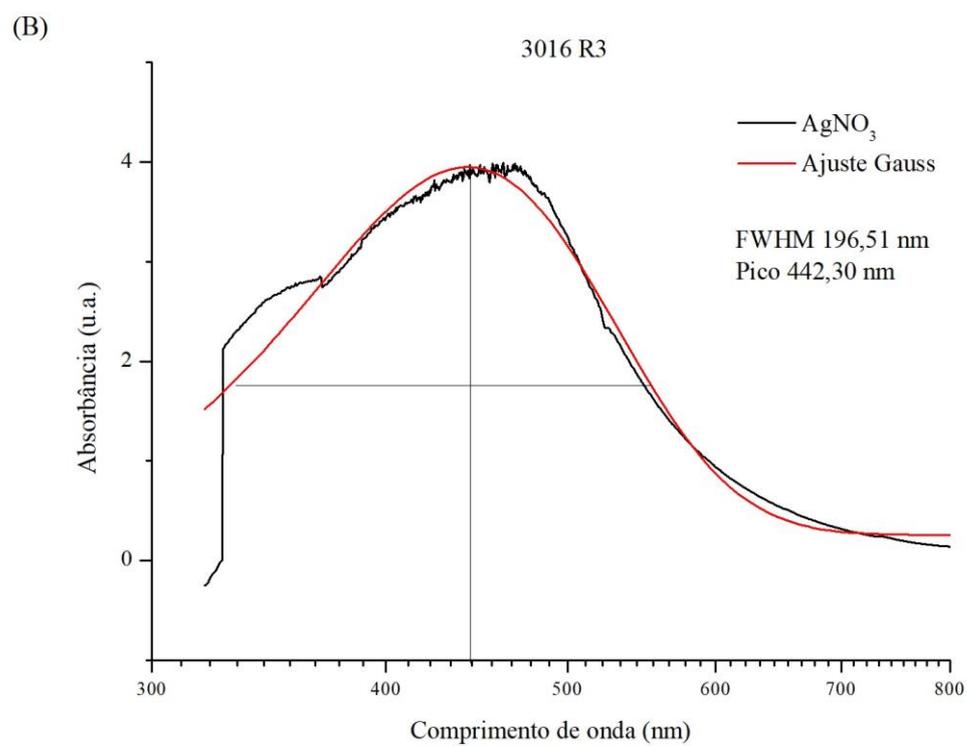
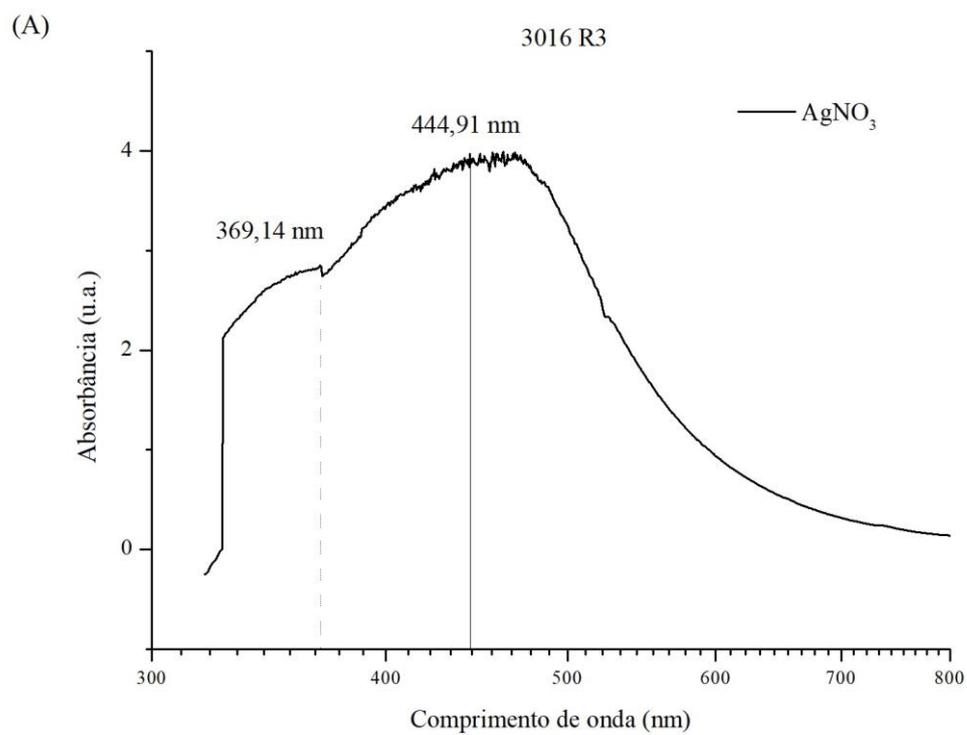
Figura 5 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das AgNPs do isolado 3013 R1. (B) Ajuste Gauss



No espectro representativo da absorção de luz do isolado 3016 R3 (Figura 6A) é observado que na região próxima a 369 nm, os valores de absorbância estão em torno 2,8, contudo esses valores começam a aumentar na região de 444 nm e chegam ao máximo de absorção na região de 460 nm.

A gaussiana do espectro referente a este isolado (Figura 6B), está em, aproximadamente, 442,30 nm e a largura a meia altura da banda é de aproximadamente 196,51 nm.

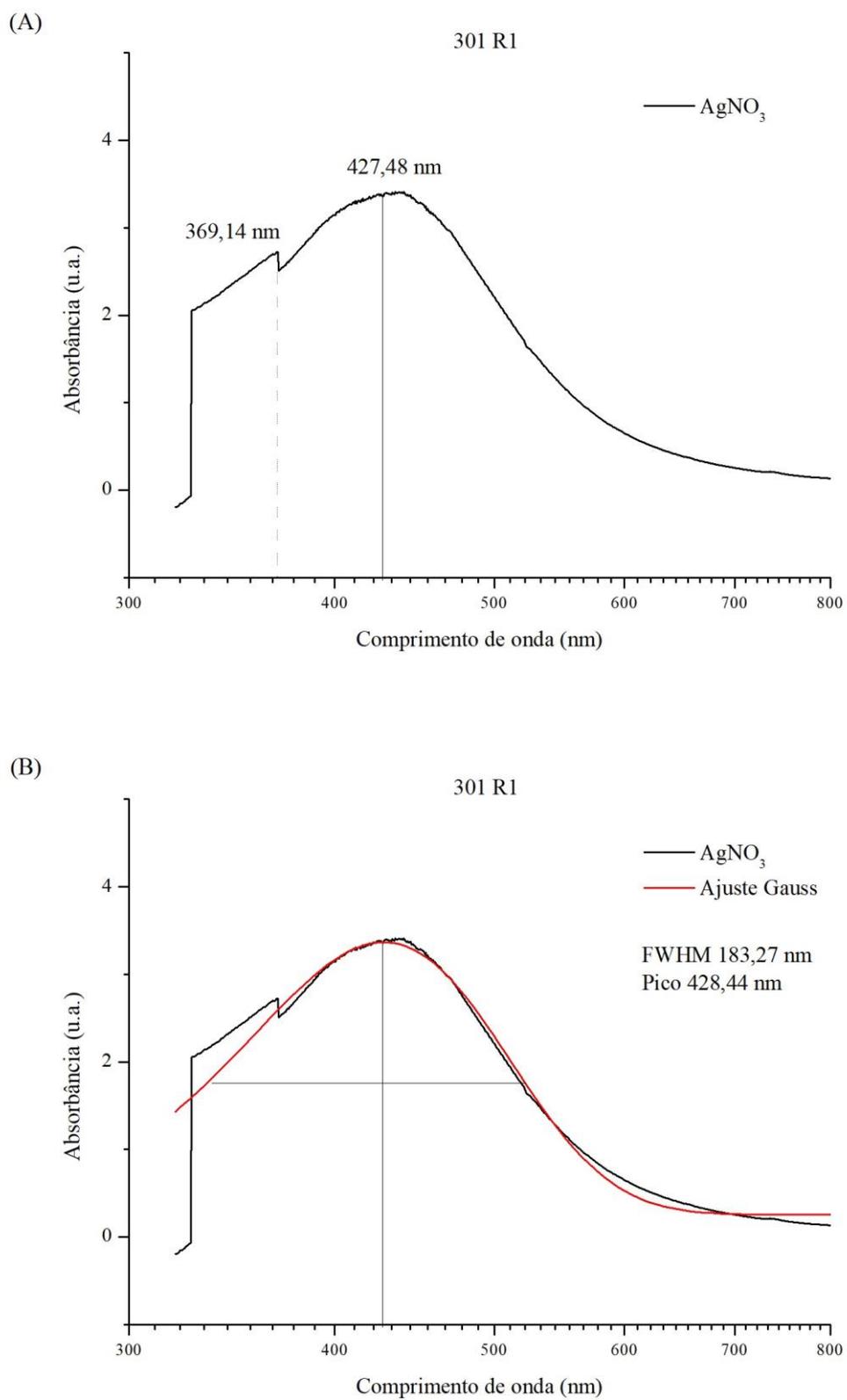
Figura 6 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das AgNPs do isolado 3016 R3. (B) Ajuste Gauss



No espectro representativo da absorção de luz do isolado 301 R1 (Figura 7A) observa-se que na região próxima a 369 nm, os valores de absorbância estão em torno 2,6, contudo esses valores começam a aumentar na região de 427 nm e chegam ao máximo de absorção na região de 445 nm.

A gaussiana do espectro referente a este isolado (Figura 7B), está em, aproximadamente, 428,44 nm e a largura a meia altura da banda é de aproximadamente 183,27 nm.

Figura 7 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das AgNPs do isolado 301 R1 (B) Ajuste Gauss



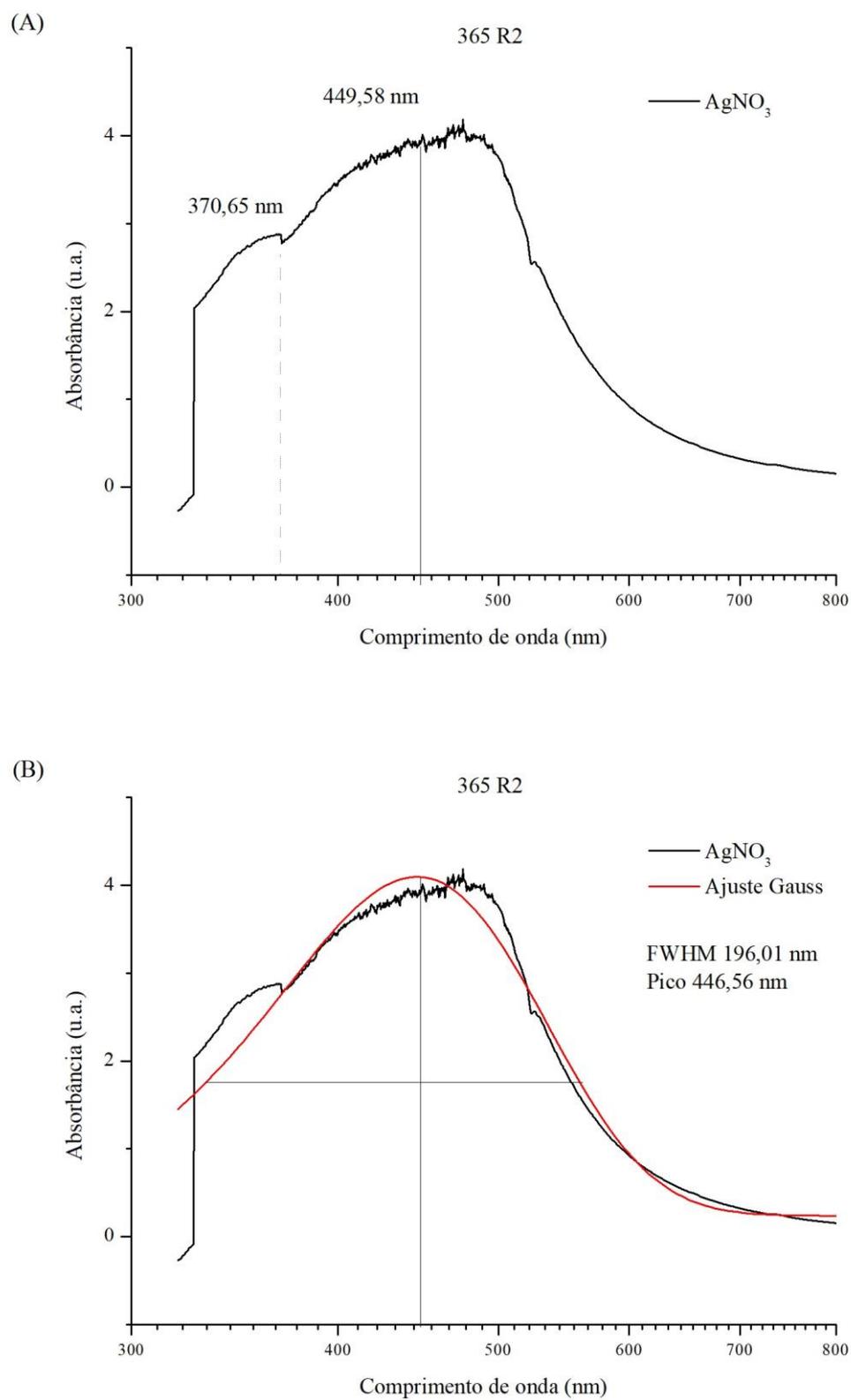
Um ombro em aproximadamente 369 - 370 nm é visualizado no espectro de absorção das misturas reacionais dos isolados fúngicos, podendo estar associado a excitações eletrônicas nos resíduos de aminoácidos aromáticos das proteínas presentes (AHMAD et al., 2003).

Estas observações indicam a possível liberação de proteínas em solução pelo *Fusarium* e sugere um mecanismo provável para a redução dos íons metálicos presentes na solução (DURAN et al., 2005).

No espectro representativo da absorção de luz do isolado 365 R2 (Figura 8A) observa-se que na região próxima a 370 nm, os valores de absorbância estão em torno 2,8, contudo esses valores começam a aumentar na região de 449 nm e chegam ao máximo de absorção na região de 475 nm.

A gaussiana do espectro referente a este isolado (Figura 8B), está em, aproximadamente, 446,56 nm e a largura a meia altura da banda é de aproximadamente 196,01 nm.

Figura 8 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das AgNPs do isolado 365 R2. (B) Ajuste Gauss



Nota-se uma diferença entre os espectros das quatro amostras obtidas, relacionada com a posição do máximo de absorção da banda *plasmon* (que varia entre 369 e 449 nm), e também com a largura a meia altura desta banda. Uma vez que todas as amostras foram preparadas usando-se os mesmos reagentes, as variações entre os espectros devem ser devidas às diferentes características das próprias NPs formadas em cada síntese (tamanho médio, forma e/ou distribuição de tamanhos).

Após o período de incubação, as misturas reacionais passaram por procedimentos de purificação das AgNPs afim de eliminar a existência de outras substâncias.

## 5.2 Purificação de nanopartículas de prata (AgNPs)

As amostras dos isolados *F. concolor* apresentaram picos de absorção a região visível de seus espectros de absorção entre 400-500 nm em 216h de reação (Figura 5, 6, 7 e 8).

As amostras foram purificadas em uma coluna de cromatografia de gel filtração, afim de eliminar contaminantes presentes nas soluções reacionais, já que as moléculas pequenas podem penetrar na maioria dos poros apresentando maior tempo de retenção, enquanto as maiores são excluídas de todos os poros. Assim, moléculas grandes movem-se rapidamente através da coluna e as pequenas (nanopartículas de prata) são eluídas lentamente pela fase móvel (ZUÑIGA, 2003).

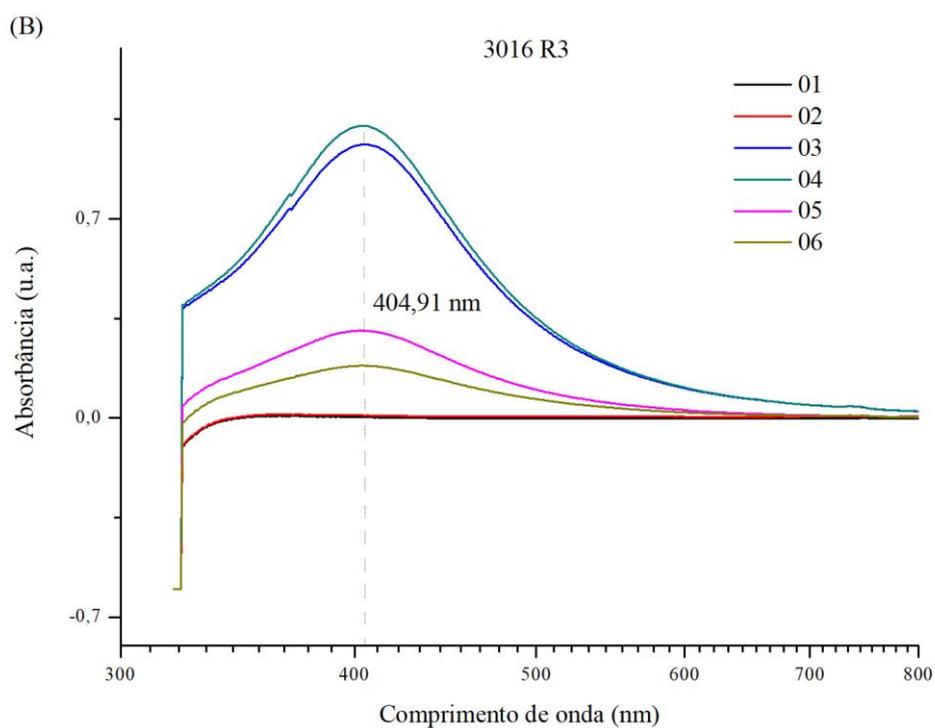
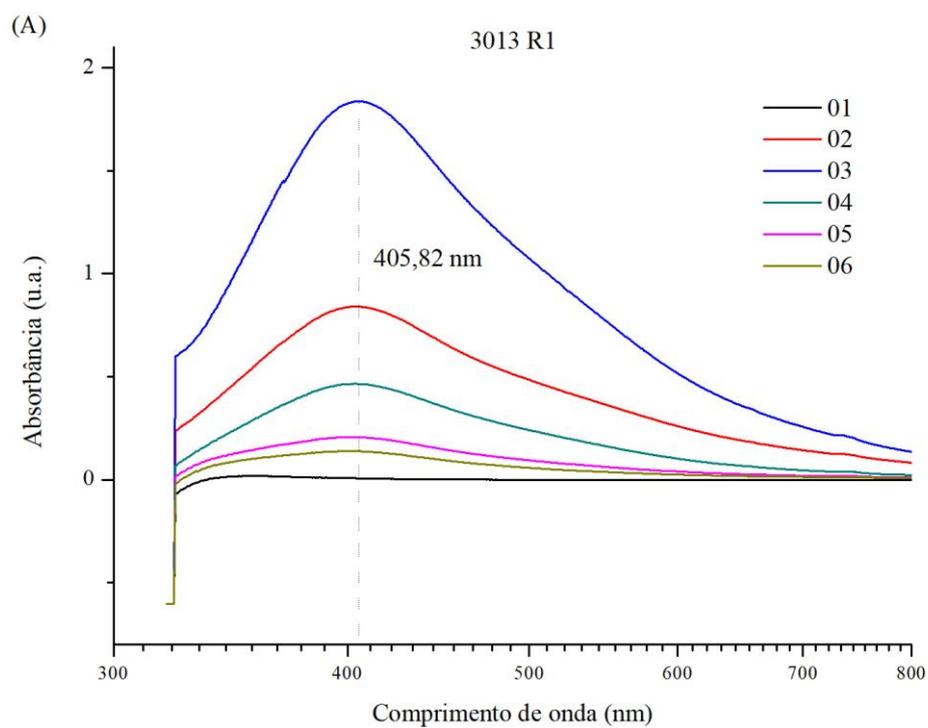
A qualidade ao longo do tempo, bem como a avaliação da integridade da solução reacional, é verificada através das etapas de purificação. Uma diminuição na intensidade do pico pode ser observada ao longo das alíquotas purificadas, indicando alíquotas livres de outros resíduos (SANGUIÑEDO et al., 2018).

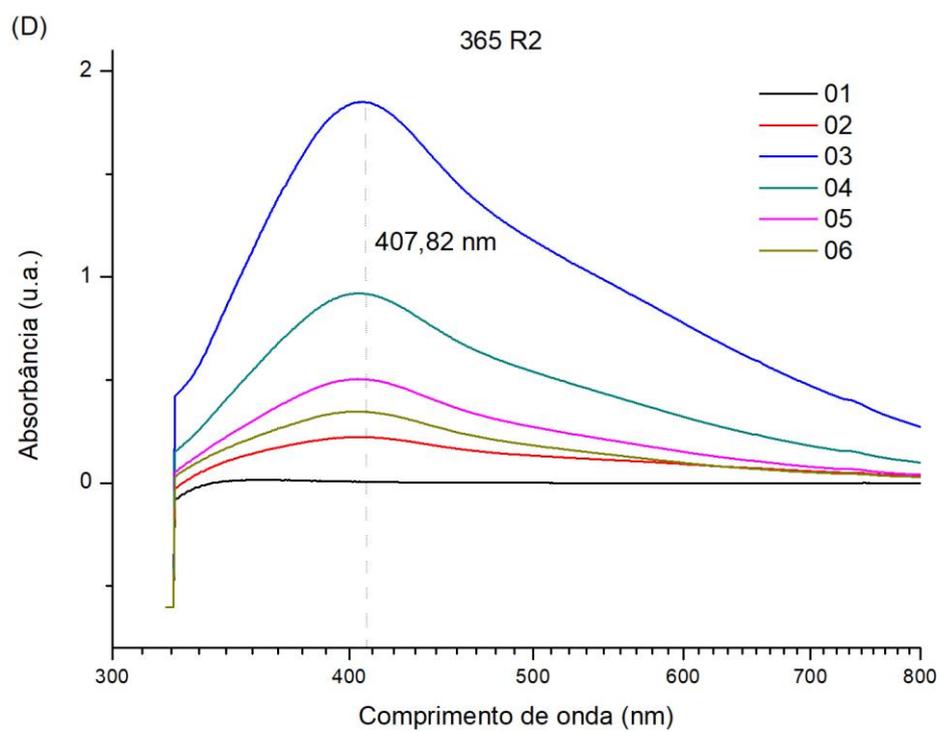
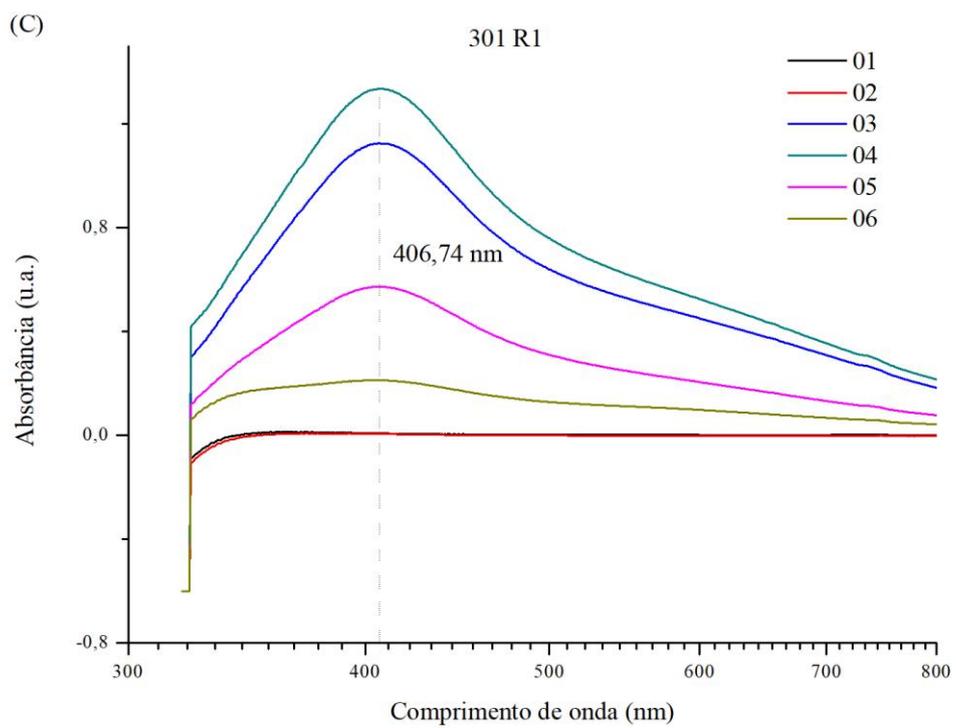
Através da purificação em coluna de cromatografia, seis alíquotas de cada solução reacional foram recolhidas e avaliadas na espectroscopia UV-Vis afim de se obter uma alíquota livre de outros resíduos, e se obter uma alíquota com leitura de absorção entre 400-670 nm, o que segundo a literatura indica a presença de nanopartículas de prata.

O espectro de absorção na região de UV-Vis das nanopartículas de prata das misturas reacionais purificadas, como ilustrado na Figura 9, indica que o pico SPR e a absorbância é máximo para as alíquotas 03 do isolado 3013 R1 (405,82 nm; 1,83) (Figura 9A), alíquota 04 do isolado 3016 R3 (404,91 nm; 1,01) (Figura 9B), alíquota 04 do isolado 301 R1 (406,74 nm; 1,33) (Figura 9C), e alíquota 03 do isolado 365 R2 (407,82 nm; 1,84) (Figura 9D).

O valor máximo de absorbância é um indicativo do número de nanopartículas presentes na solução coloidal. O aumento na absorbância no UV-Vis em função do tempo de síntese demonstra um acréscimo gradativo da concentração de nanopartículas de prata na solução reacional (SANTANA, 2012).

Figura 9 – Espectro de absorção no UV-Vis das AgNPs purificadas dos isolados 3013 R1 (A), 3016 R3 (B), 301 R1 (C), 365 R2 (D)





Observa-se que os menores valores de absorvância obtidos nesse caso foram das primeiras alíquotas purificadas (Tabela 3), esse comportamento pode ser justificado pelo processo de purificação em que pelo sistema de cromatografia.

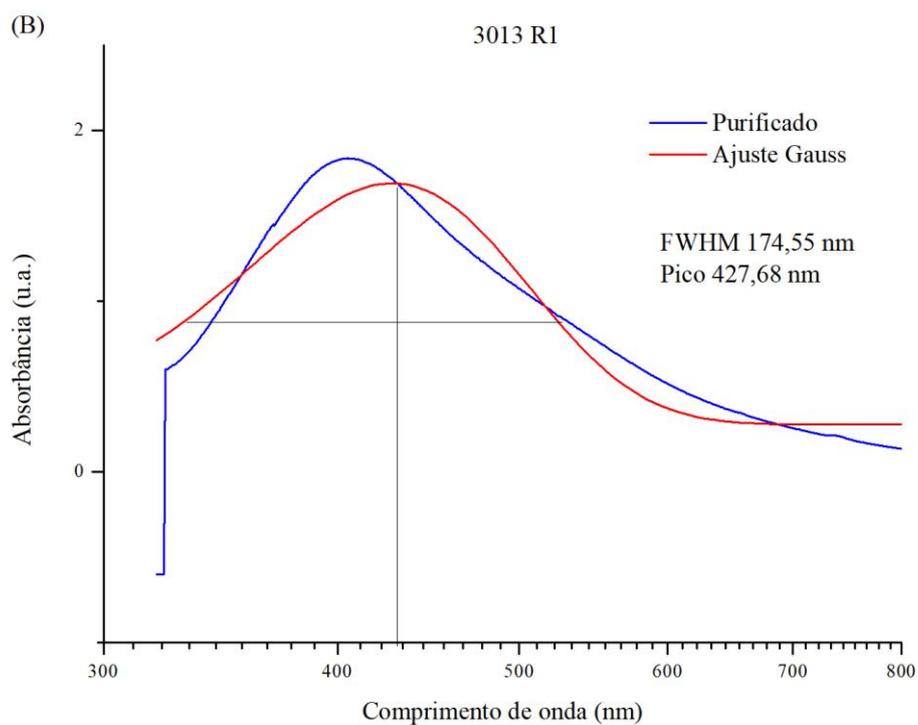
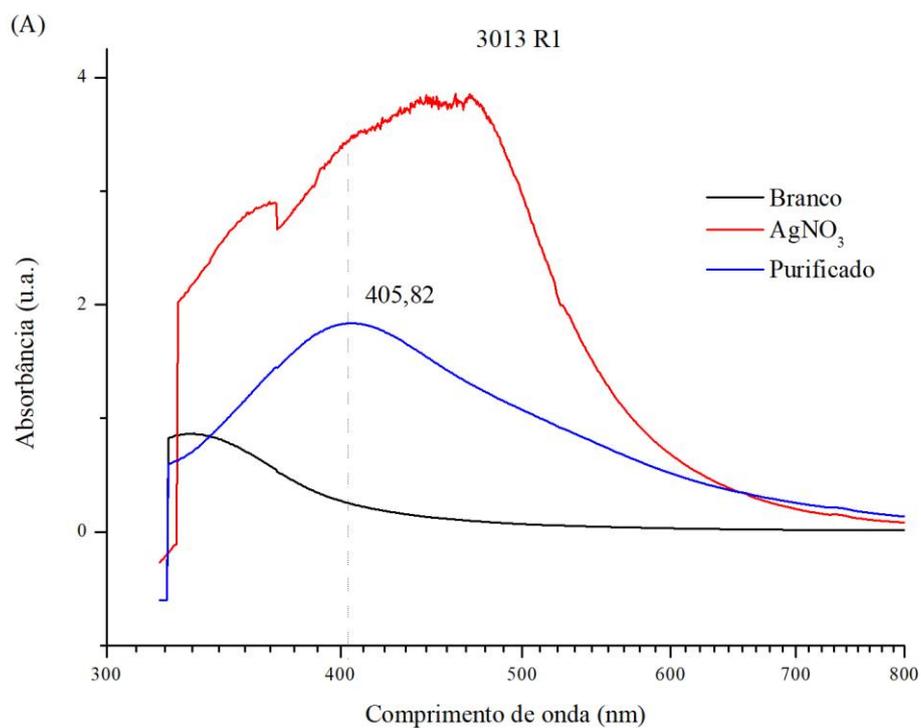
Tabela 3 – Absorvância das alíquotas purificadas dos isolados fúngicos efetivos na produção de AgNPs

Alíquota	3013 R1	3016 R3	301 R1	365 R2
	Absorvância			
<b>1</b>	0,0021	0,0067	0,0073	0,0070
<b>2</b>	0,8385	0,0144	0,0073	0,2228
<b>3</b>	1,8336	0,9573	1,1156	1,8426
<b>4</b>	0,4573	1,0187	1,3340	0,9215
<b>5</b>	0,2033	0,3057	0,5699	0,5087
<b>6</b>	0,1397	0,1830	0,2172	0,3499

A Figura 10A a seguir mostra o espectro representativo da absorção de luz referente a alíquota purificada do isolado 3013 R1 que obteve maior absorvância (1,83), em que o máximo de absorção está em, 405,82 nm, comparada ao espectro da absorção da amostra branco, em que não há adição de Nitrato de prata, apenas o filtrado fúngico, e ao espectro da absorção da amostra da solução reacional antes da purificação.

A gaussiana do espectro referente a alíquota purificada (Figura 10B), está em, aproximadamente, 427,68 nm e a largura a meia altura da banda é de aproximadamente 174,55 nm.

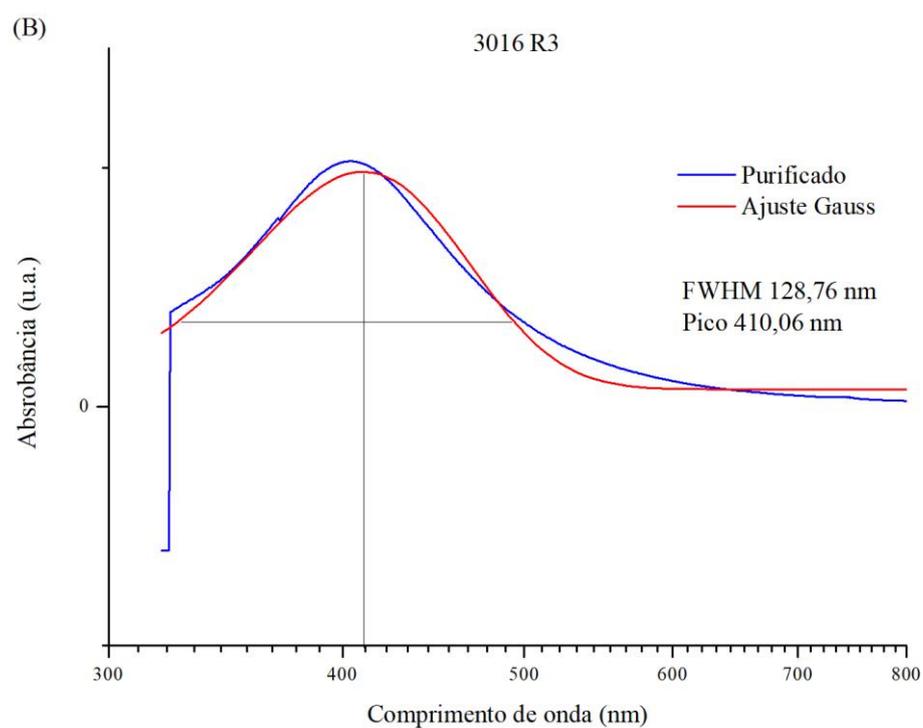
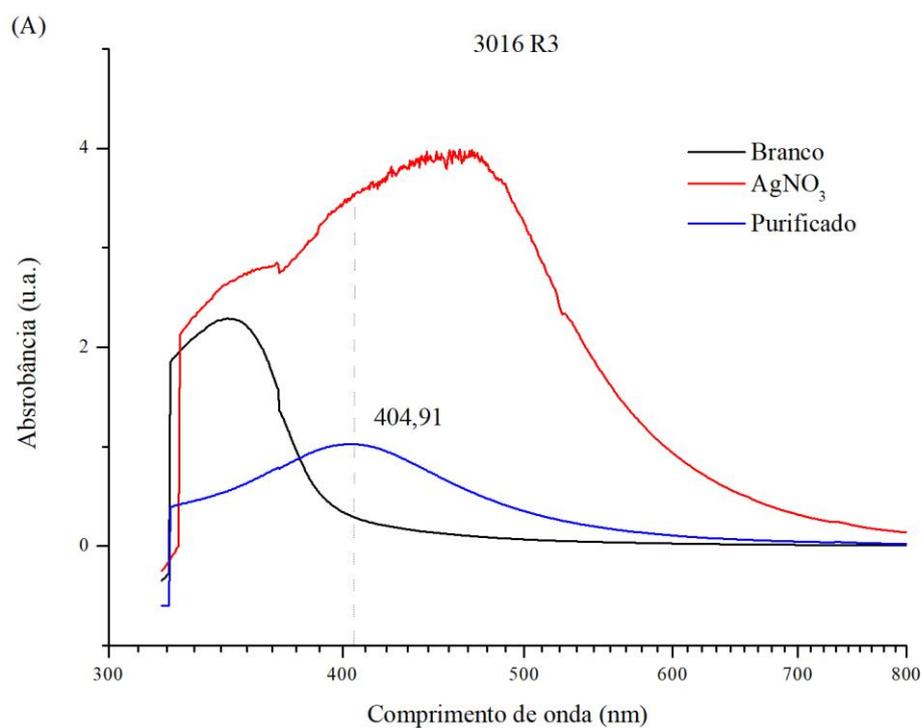
Figura 10 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das amostras Branco, AgNPs e alíquota purificada do isolado 3013 R1. (B) Ajuste Gauss da alíquota purificada



A Figura 11A a seguir mostra o espectro representativo da absorção de luz referente a alíquota purificada do isolado 3016 R3 que obteve maior absorbância (1,01), em que o máximo de absorção está em, 404,91 nm, comparada ao espectro da absorção da amostra Branco, em que não há adição de Nitrato de prata, apenas o filtrado fúngico, e ao espectro da absorção da amostra da solução reacional antes da purificação.

A gaussiana do espectro referente a alíquota purificada (Figura 11B), está em, aproximadamente, 410,06 nm e a largura a meia altura da banda é de aproximadamente 128,76 nm.

Figura 11 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das amostras Branco, AgNPs e alíquota purificada do isolado 3016 R3. (B) Ajuste Gauss da alíquota purificada



A solução reacional do isolado fúngico de semente 3013 R1 tem o comprimento de onda do máximo de absorção maior que o do 3016 R3 ( $427,68 > 410,06$ ) e a largura a meia altura maior ( $174,55 > 128,76$ ). Esses valores refletem o fato de que “com aumento do tamanho das partículas a banda de plasmon de superfície torna-se cada vez mais larga e desloca-se para comprimentos de onda maiores (MELO JR et al., 2012). Na solução reacional do isolado 3013 R1 possivelmente há partículas maiores do que na solução reacional do isolado 3016 R3, ou seja, nela houve uma maior agregação e crescimento de NPs.

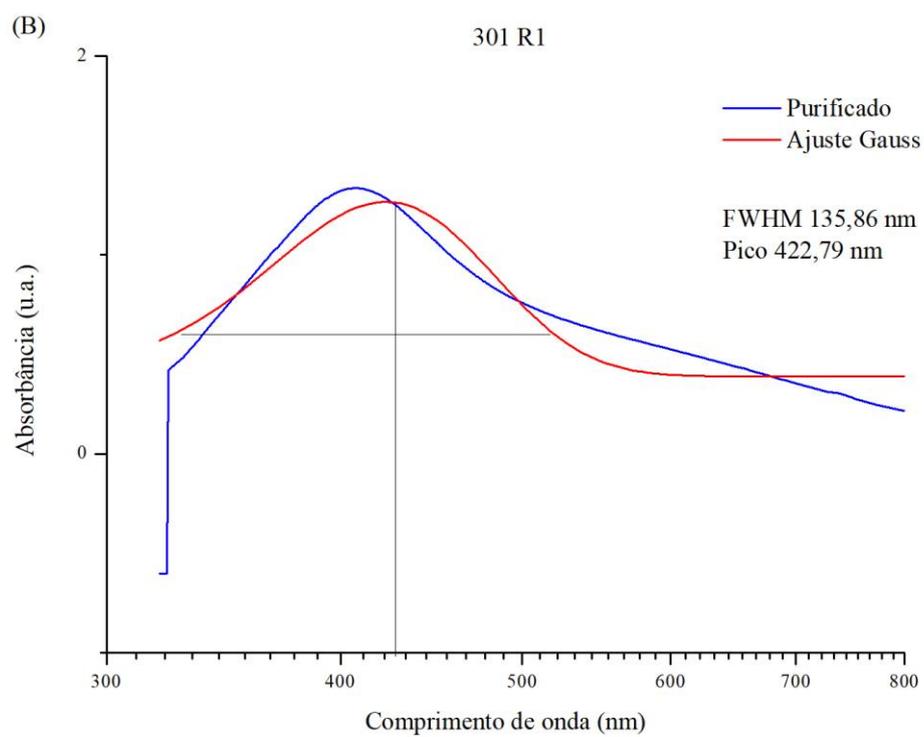
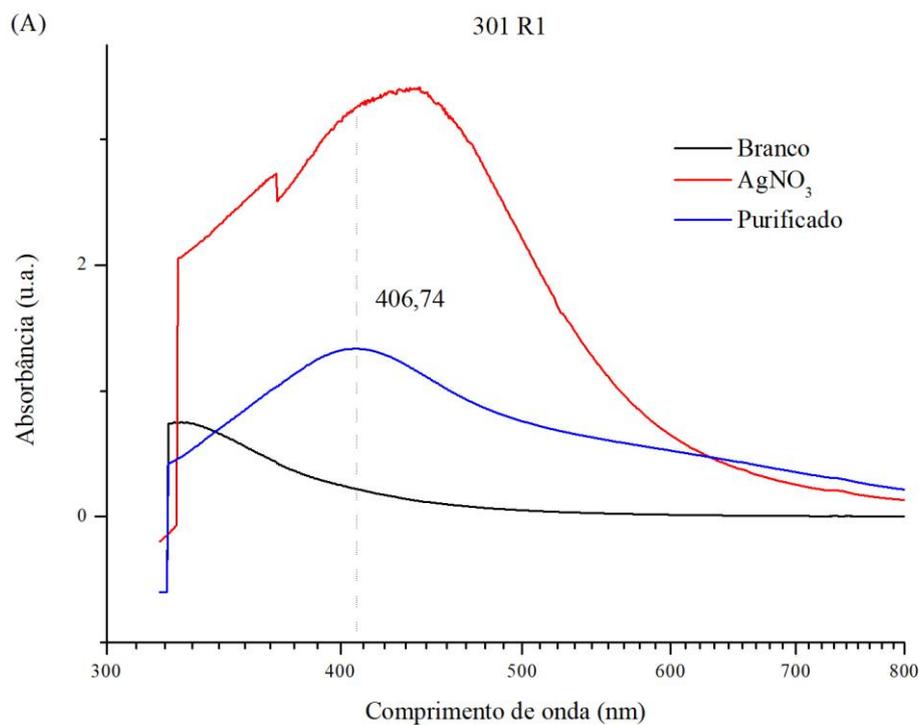
É conhecido que o máximo em absorbância e também a largura a meia altura da banda *plasmon* dependem de um grande número de fatores, entre eles o tamanho médio, a distribuição de tamanhos, o formato, e ainda a natureza do meio em que as NPs se encontram.

As nanopartículas que possuem menor diâmetro tendem a ter o comprimento de onda do máximo de absorção deslocado para a região do espectro de luz do ultravioleta, enquanto um aumento do tamanho médio das nanopartículas é seguido por um deslocamento para a região do espectro de luz do vermelho (ANDRADE et al., 2012).

A Figura 12A a seguir mostra o espectro representativo da absorção de luz referente a alíquota purificada do isolado 301 R1 que obteve maior absorbância (1,33), em que o máximo de absorção está em, 406,74 nm, comparada ao espectro da absorção da amostra Branco, em que não há adição de Nitrato de prata, apenas o filtrado fúngico, e ao espectro da absorção da amostra da solução reacional antes da purificação.

A gaussiana do espectro referente a alíquota purificada (Figura 12B), está em, aproximadamente, 422,79 nm e a largura a meia altura da banda é de aproximadamente 135,86 nm.

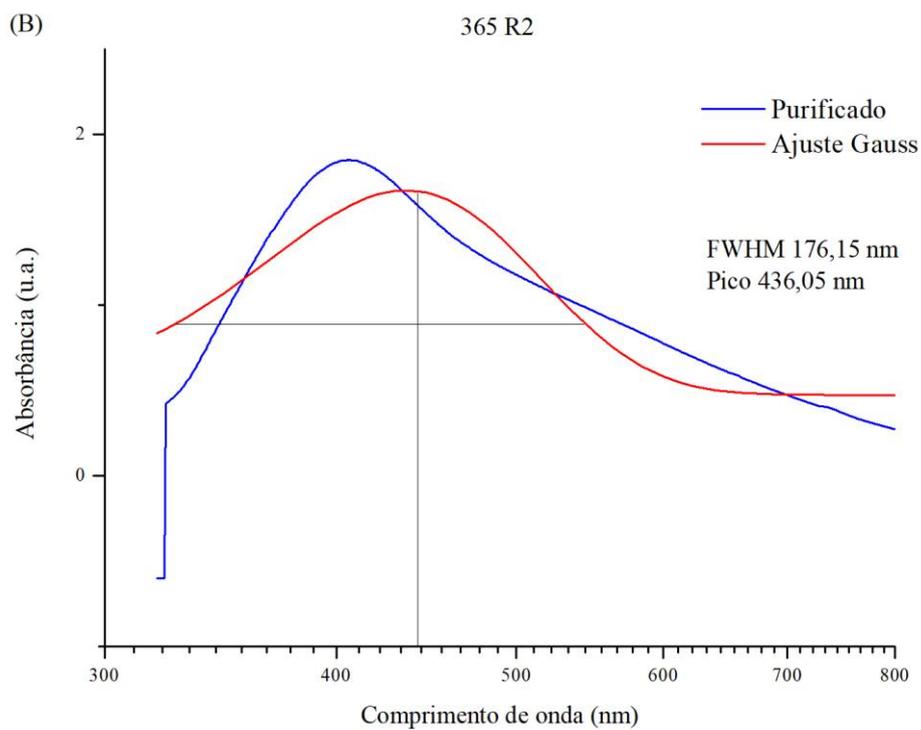
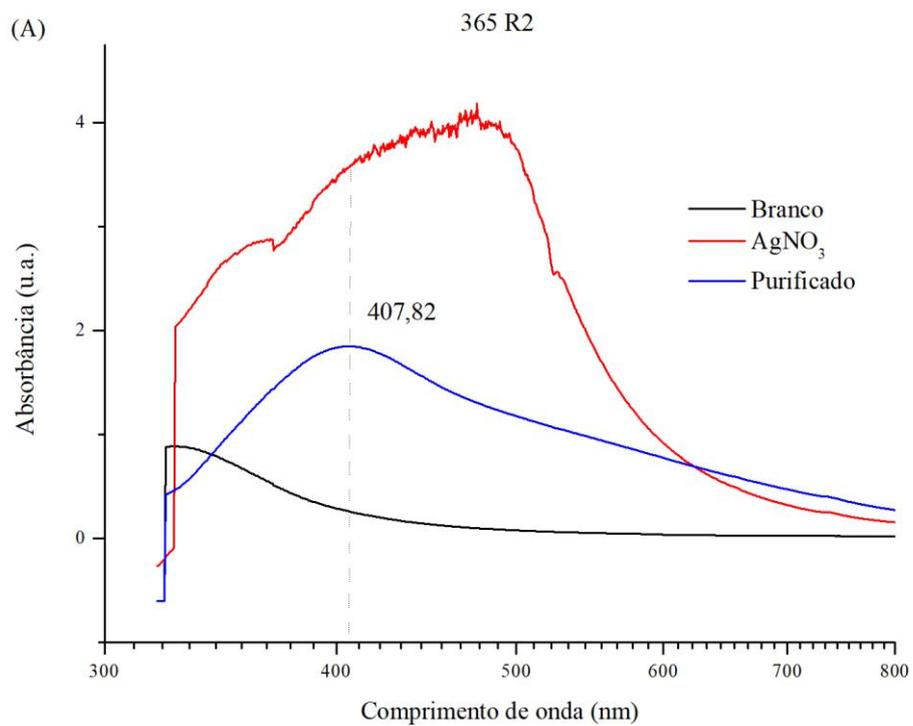
Figura 12 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das amostras Branco, AgNPs e alíquota purificada do isolado 301 R1. (B) Ajuste Gauss da alíquota purificada



A Figura 13A a seguir mostra o espectro representativo da absorção de luz referente a alíquota purificada do isolado 365 R2 que obteve maior absorbância (1,84), em que o máximo de absorção está em, 407,82 nm, comparada ao espectro da absorção da amostra Branco, em que não há adição de Nitrato de prata, apenas o filtrado fúngico, e ao espectro da absorção da amostra da solução reacional antes da purificação.

A gaussiana do espectro referente a alíquota purificada (Figura 13B), está em, aproximadamente, 436,05 nm e a largura a meia altura da banda é de aproximadamente 176,15 nm.

Figura 13 – (A) Espectro de absorção no UV-Vis das amostras Branco, AgNPs e alíquota purificada do isolado 365 R2. (B) Ajuste Gauss da alíquota purificada



A solução reacional do isolado fúngico de folha 365 R2 tem o comprimento de onda do máximo de absorção maior que o do 301 R1 ( $436,05 > 422,79$ ) e a largura a meia altura maior ( $176,15 > 135,86$ ).

As AgNPs apresentam pico de absorção de radiação eletromagnética no comprimento de onda entre 400-500 nm devido à sua ressonância plasmônica de superfície. Neste pico ocorre uma variação de cor característica que varia de marrom avermelhado para marrom escuro, de acordo com o tamanho das NPs formadas (ALBERNAZ, 2014).

De acordo com Sharma et al. (2009), picos que variam de 380 a 400 nm apresentam coloração amarelo ouro e caracteriza partículas menores, enquanto Albernaz (2014) comenta que a coloração que varia de marrom avermelhado a marrom escuro varia de acordo com o tamanho das AgNPs.

Outro detalhe interessante de ser observado é altura das bandas (intensidade do sinal) que é relacionado com a quantidade/densidade de partículas existentes nas amostras. Nesse caso a altura da banda do isolado 3013 R1 é maior que dos outros isolados (1,41) (Tabela 4). Isso implica na possibilidade de existir na amostra da solução reacional do isolado 3013 R1 maior quantidade de NPs do que nas demais amostras (TEXEIRA, 2014).

A Tabela 4, a seguir, resume os dados relacionados a regressão das curvas obtidas (gaussianas), dados de R-SQUARE, Máximo de absorção, largura a meia altura – FWHM e altura/intensidade – HEIGHT de todas as amostras.

Tabela 4 – Dados referentes ao Gauss fit (regressão linear) dos espectros UV-Vis obtidos das amostras - OriginPro 8

<b>GAUSS FIT</b>				
<b>Isolado</b>	<b>R-SQUARE</b>	<b>Máximo de absorção</b>	<b>FWHM</b>	<b>HEIGHT</b>
<b>3013 R1</b>	0,90562	427,68000	174,55900	1,41430
<b>3016 R3</b>	0,92783	410,06870	128,76120	0,91013
<b>301 R1</b>	0,82857	422,79705	135,86837	0,87713
<b>365 R2</b>	0,82392	436,05190	176,15750	1,19878

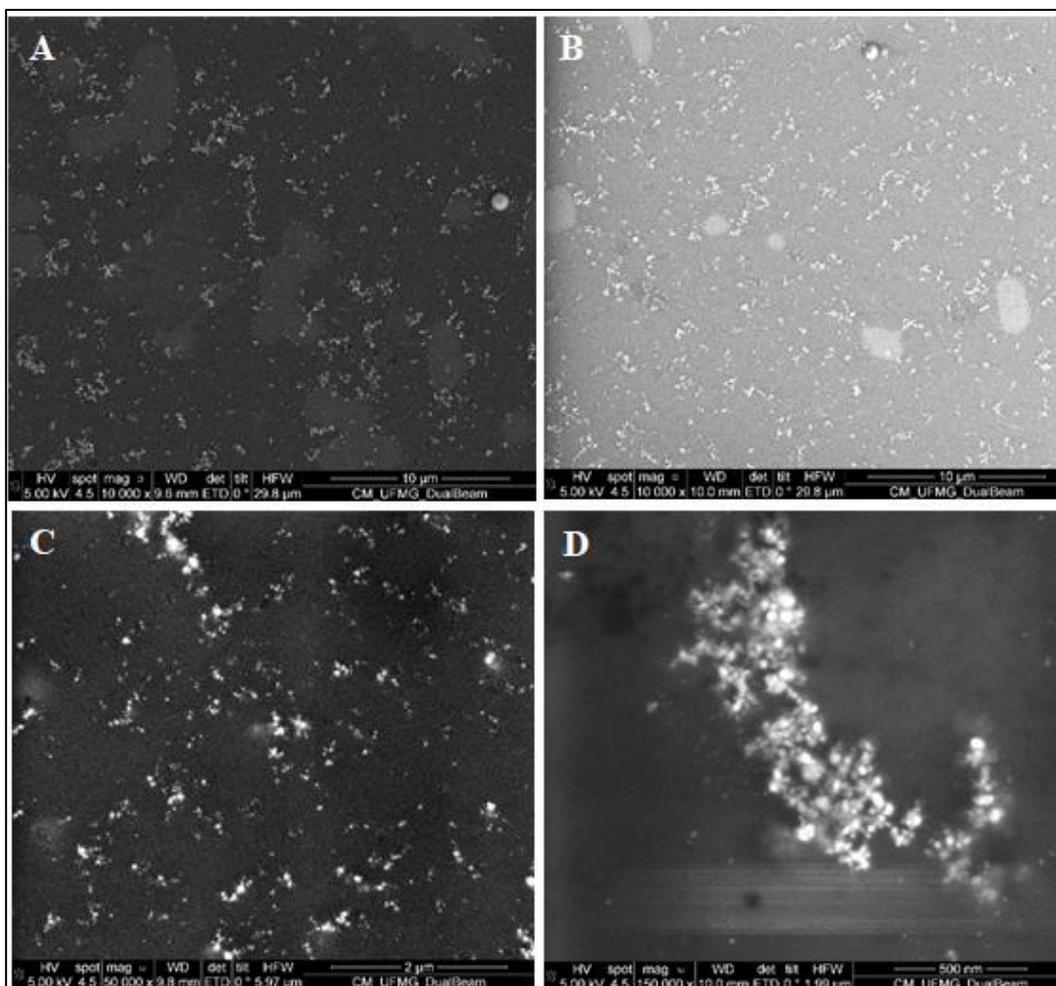
### 5.3 Caracterização de nanopartículas de prata (AgNPs)

#### 5.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

As alíquotas das misturas reacionais dos quatro isolados fúngicos (3013 R1, 3016 R3, 301 R1 e 365 R2) após a purificação foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura (MEV) para comprovar a presença das nanopartículas de prata no meio. As suspensões das alíquotas foram gotejadas sobre uma fita de fibra de carbono e secas a temperatura ambiente.

O resultado é apresentado na Figura 14.

Figura 14 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura. A = 3013 R1, B = 3016 R3, C = 301 R1, D = 365 R2



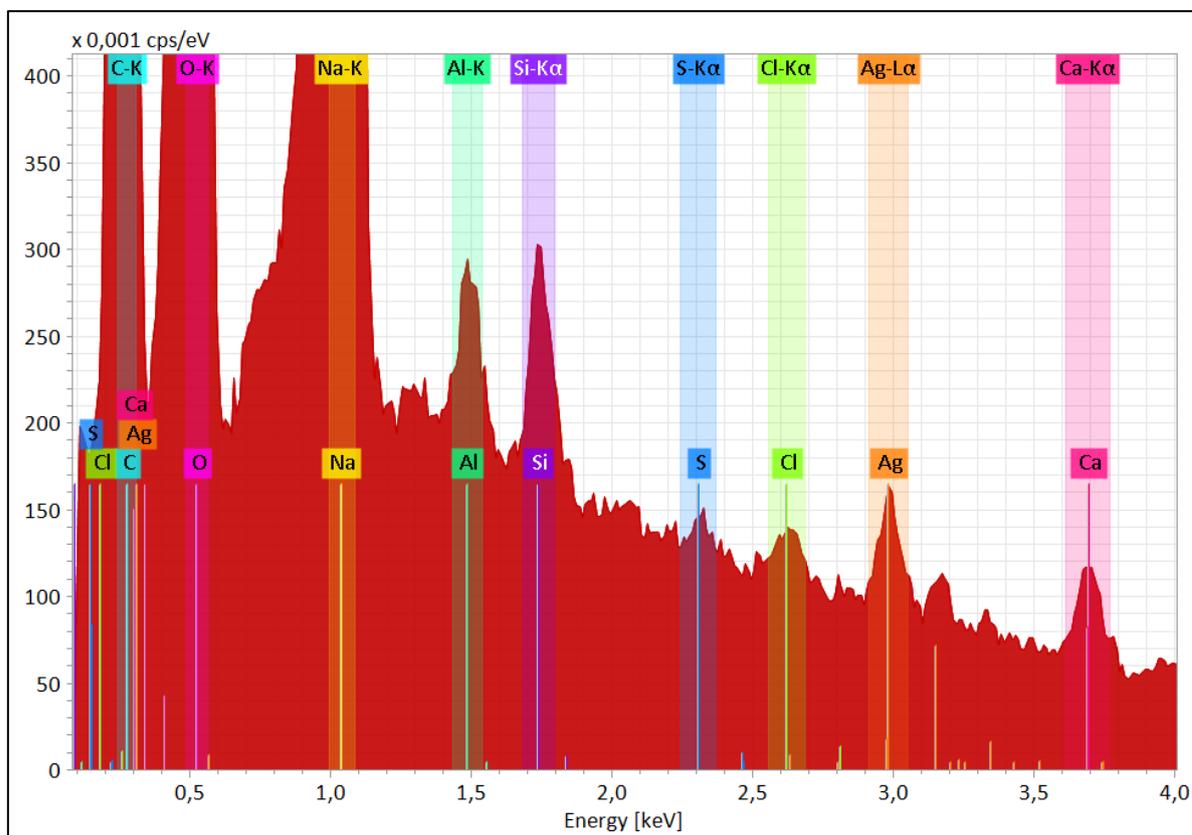
As imagens obtidas mostram que as nanopartículas estão presentes nas quatro soluções reacionais dos isolados fúngicos.

### 5.3.2 Análise EDS

Análise de EDS (equipamento acoplado ao MEV) foi aplicada a solução reacional apresentada na Figura 14C, durante a realização da técnica de microscopia.

O resultado obtido é apresentado na Figura 15.

Figura 15 – EDS realizado mostrando os elementos químicos presentes na solução reacional do isolado 301 R1



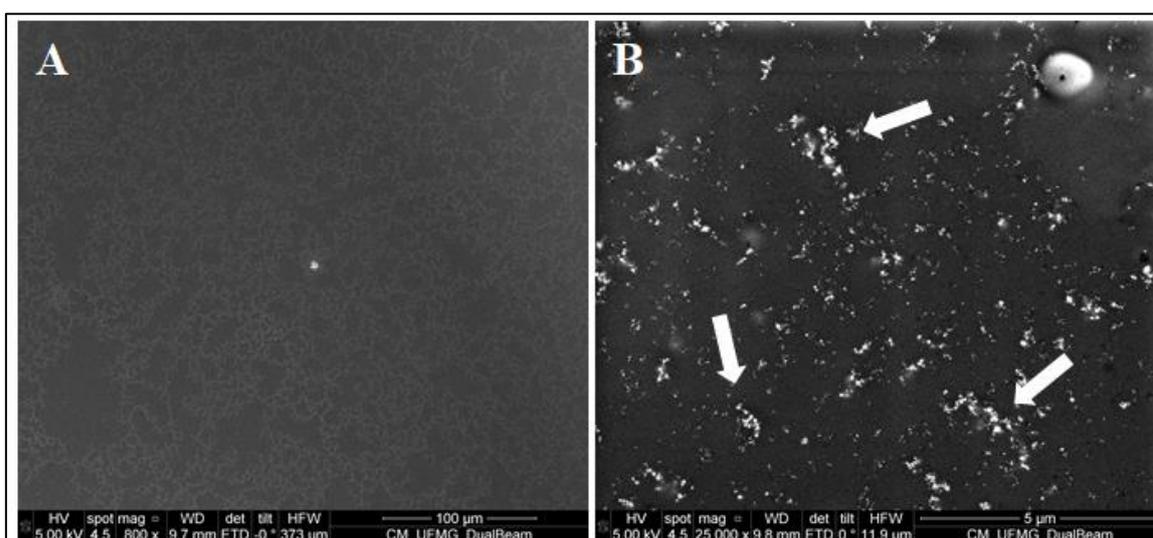
Como esperado, o sinal de prata detectado na solução reacional indica a presença deste elemento resultado da incorporação do nitrato de prata ao tratamento prévio feito por 216h.

O espectro gerado pelo EDS detectou além da prata, a presença de cálcio (Ca), carbono (C), oxigênio (O), sódio (Na), potássio (K) e enxofre (S), elementos que fazem parte da composição natural das células, e podem estar associados às proteínas.

Foram encontrados também na amostra, cloro (Cl) e alumínio (Al), que podem estar relacionados com modificações pós-traducionais nas proteínas, ou provenientes do meio de cultura utilizado no crescimento do *Fusarium*, ou da solução tampão utilizada para a lavagem da coluna de cromatografia durante o processo de purificação das misturas reacionais. Resultados semelhantes foram encontrados por Ballottin (2014) trabalhando com a síntese de nanopartículas de prata produzidas biogênica e extracelularmente utilizando o fungo *Fusarium oxysporum*.

A formação das nanopartículas é, por isso, confirmada nas imagens em que há pontos brancos indicados por setas na Figura 16B. Com isso, tais pontos são, de fato, as nanopartículas de prata, já que a única diferença, ao ser comparado às situações controle na Figura 16A, foi a incubação com nitrato de prata. Outro aspecto importante a ser considerado, que permite concluir que os pontos brancos visualizados são nanopartículas de prata, é que a técnica da microscopia de varredura e este EDS acoplado permite apenas a avaliação da composição elementar superficial.

Figura 16 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do isolado 301 R1. A = Solução reacional controle, B = Solução reacional com AgNPs. Setas brancas indicam nanopartículas de prata



#### 5.4 Atividade antifúngica de nanopartículas de prata no controle *in vitro* dos fitopatógenos

Foi observado efeito significativo das misturas reacionais sobre o crescimento micelial de *C. guaranicola* (I02 e I11), *Colletotrichum* spp. (IRPD-18) e *C. cassicola* (T14-3) (Tabela 5).

Tabela 5 – Média do diâmetro do crescimento micelial de fitopatógenos submetidos a diferentes doses de nanopartículas de prata

Fungo Fitopatogênico	Solução reacional	Doses			
		0 µL (Test.)	100 µL	500 µL	1000 µL
<i>Colletotrichum guaranicola</i> (I02)	3013 R1	7,83 a	7,60 a	6,30 c	5,47 d
	3016 R3	7,85 a	7,23 b	5,90 c	4,62 e
	301 R1	7,83 a	7,20 b	5,79 c	5,26 d
	365 R2	7,93 a	7,38 b	6,05 c	6,25 c
CV% 5,40					
<i>Colletotrichum guaranicola</i> (I11)	3013 R1	7,85 a	6,41 b	6,33 b	4,37 d
	3016 R3	7,91 a	6,91 b	6,69 b	5,09 d
	301 R1	7,79 a	6,98 b	6,00 c	4,64 d
	365 R2	7,98 a	6,70 b	6,20 b	5,40 c
CV% 9,41					
<i>Colletotrichum spp.</i> (IRPD-18)	3013 R1	7,48 a	5,41 c	5,98 b	5,11 c
	3016 R3	7,72 a	5,83 b	5,32 c	4,90 c
	301 R1	7,81 a	4,98 c	5,59 c	5,35 c
	365 R2	7,96 a	6,15 b	6,25 b	5,26 c
CV% 8,91					
<i>Corynespora cassicola</i> (T14-3)	3013 R1	7,78 a	5,13 b	6,28 b	5,11 b
	3016 R3	7,85 a	6,00 b	5,63 b	5,30 b
	301 R1	7,83 a	5,73 b	5,59 b	5,59 b
	365 R2	7,96 a	6,36 b	6,39 b	5,79 b
CV% 9,91					

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Foi observado menor crescimento micelial para todos os fitopatógenos na dose de 1000 µL, com destaque para a solução reacional do isolado 3016 R3 para o fitopatógeno I02 (Figura 17); as soluções reacionais dos isolados 3013 R1 e 301 R1 para o fitopatógeno I11 (Figura 18); a solução reacional do isolado 301 R1 para o fitopatógeno IRPD-18 e; a solução reacional do isolado 3013 R1 para o fitopatógeno T14-3 (Figura 19).

Figura 17 – Crescimento micelial do fitopatógeno *C. guaranicola* (IO2). A – Testemunha; B – 1000  $\mu$ L da solução reacional do isolado 3016 R3

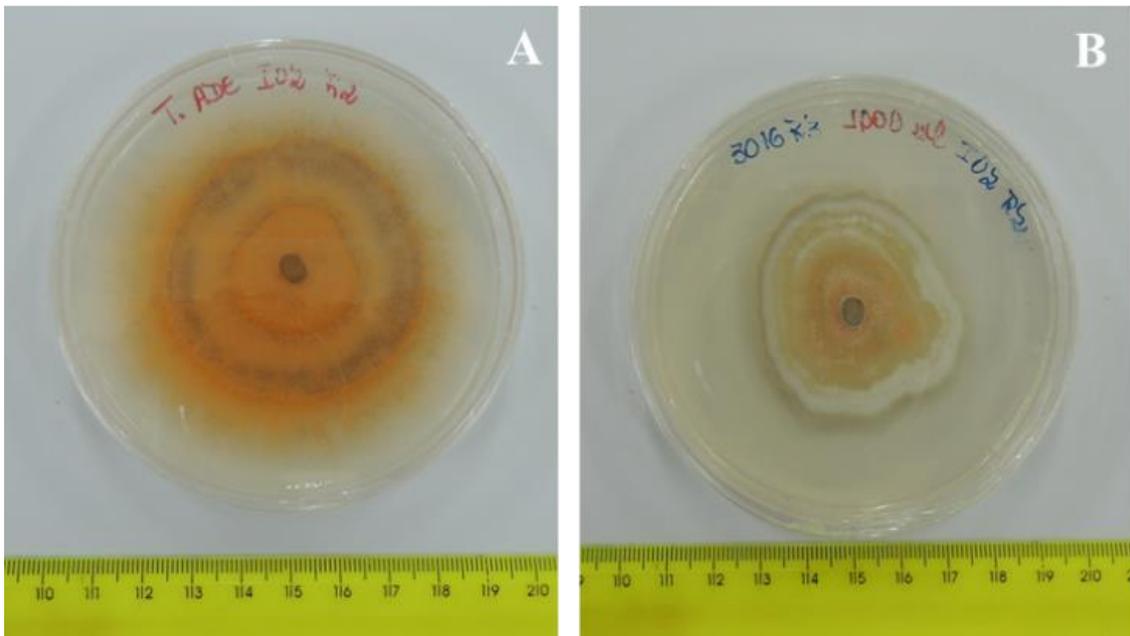


Figura 18 – Crescimento micelial do fitopatógeno *Coletotrichum* spp. (I11). A – Testemunha; B – 1000  $\mu$ L da solução reacional do isolado 301 R1

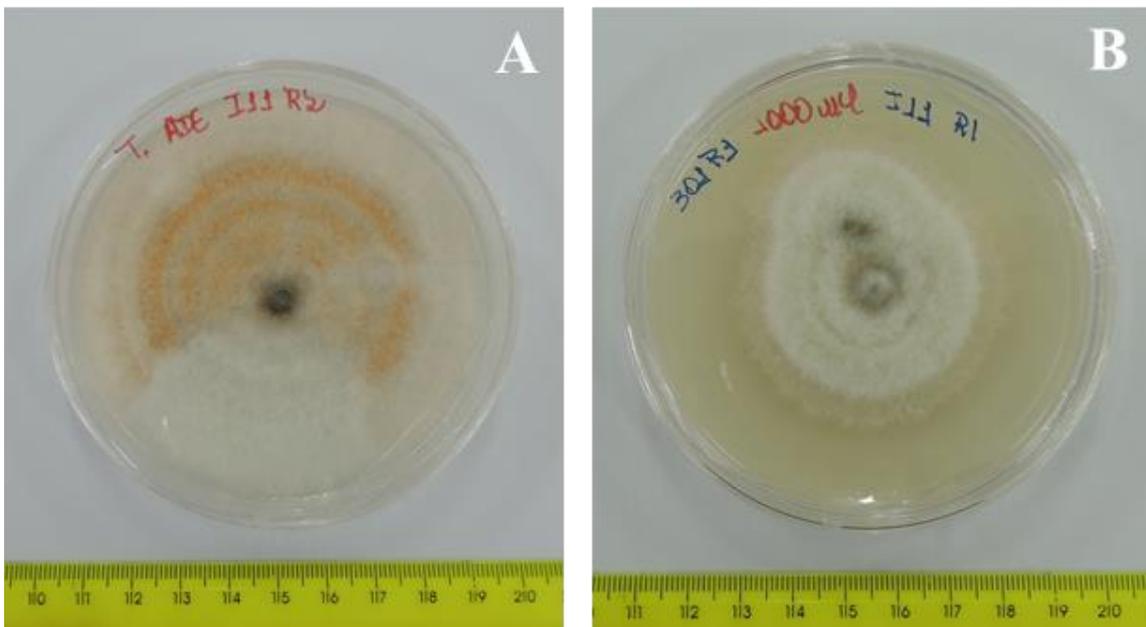
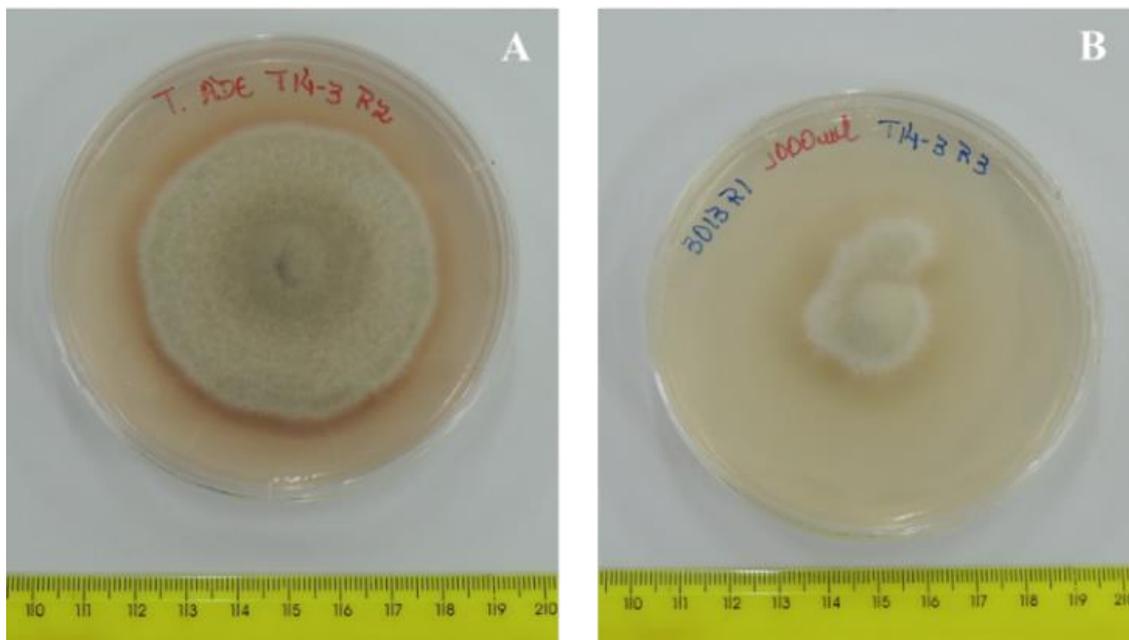


Figura 19 – Crescimento micelial do fitopatógeno *C. cassiicola* (T14-3). A – Testemunha; B – 1000  $\mu$ L da solução reacional do isolado 3013 R1



Foi observado que quanto maior a dose da alíquota das soluções reacionais aplicada, menor o crescimento micelial dos fitopatógenos *C. guaranicola* (I02 e I11) e *Coletotrichum* spp. (IRPD-18); não havendo diferença estatística entre as doses aplicadas na avaliação do crescimento micelial do fitopatógeno *C. cassiicola* (T14-3).

Foi observado efeito significativo das soluções reacionais sobre a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) sobre os fitopatógenos *C. guaranicola* I02 e I11 (Tabela 6).

A solução reacional do isolado fúngico 3013 R1 na dose de 100  $\mu$ L apresentou menor PIC, correspondendo 5,93% de inibição do crescimento micelial do fitopatógeno *C. guaranicola* (I02), seguido pela solução reacional do isolado fúngico 365 R2, com 6,90% de inibição para o mesmo fitopatógeno.

A solução reacional do isolado fúngico 3013 R1 apresentou a maior porcentagem de inibição do crescimento micelial para o fitopatógeno *C. guaranicola* (I11), com 44,22%, seguido pela solução reacional do isolado fúngico 3016 R3, com 41,12% de inibição para o fitopatógeno I02.

Para o fitopatógeno *C. guaranicola* (I11), foi observado que as alíquotas de 100  $\mu$ L e 500  $\mu$ L não diferiram estatisticamente entre si, ocorrendo maior percentual de inibição pela solução reacional do isolado 3013 R1 na dose de 100  $\mu$ L (18,22%), e pela solução reacional do isolado 365 R2 na dose de 500  $\mu$ L (22,24%).

Foi observado para os fitopatógenos I02 e I11 que quanto maior a dose da alíquota das soluções reacionais, ocorre uma maior inibição do crescimento micelial.

Para os fitopatógenos *Colletotrichum* spp. (IRPD-18) e *C. cassicola* (T14-3), o percentual de inibição do crescimento micelial não diferiram entre si estatisticamente quanto maior a dose aplicada. A solução reacional do isolado 3013 R1 apresentou menor PIC para ambos fitopatógenos, com 19,81% e 19,19% respectivamente, na dose de 500  $\mu$ L.

Tabela 6 – Crescimento radial diário – CRd e Percentual de inibição do crescimento micelial – PIC, expostos a diferentes doses de nanopartículas de prata

Fungo Fitopatogênico	Solução reacional	CRd (cm)				PIC (%)			
		Doses				Doses			
		0 µL (Test.)	100 µL	500 µL	1000 µL	0 µL (Test.)	100 µL	500 µL	1000 µL
<i>Colletotrichum guaranicola</i> (I02)	3013 R1	0,52 a	0,50 a	0,41 c	0,35 d	0,0 a	5,93 b	19,32 c	30,13 d
	3016 R3	0,52 a	0,48 b	0,38 c	0,29 e	0,0 a	7,90 b	24,75 c	41,12 e
	301 R1	0,52 a	0,47 b	0,37 c	0,34 d	0,0 a	8,04 b	25,95 c	32,64 d
	365 R2	0,53 a	0,49 b	0,39 c	0,41 c	0,0 a	6,90 b	23,58 c	21,13 c
		CV% 5,84				CV% 31,65			
<i>Colletotrichum guaranicola</i> (I11)	3013 R1	0,61 a	0,49 b	0,48 b	0,32 d	0,0 a	18,22 b	19,20 b	44,22 c
	3016 R3	0,61 a	0,53 b	0,51 b	0,38 d	0,0 a	12,54 b	15,36 b	35,56 c
	301 R1	0,60 a	0,54 b	0,45 c	0,34 d	0,0 a	10,38 b	23,10 b	40,37 c
	365 R2	0,62 a	0,51 b	0,47 b	0,40 c	0,0 a	16,06 b	22,24 b	32,36 c
		CV% 10,20				CV% 42,11			
<i>Colletotrichum spp.</i> (IRPD-18)	3013 R1	0,34 a	0,24 c	0,27 b	0,23 c	0,0 a	27,66 b	19,81 b	31,18 b
	3016 R3	0,36 a	0,26 b	0,24 c	0,22 c	0,0 a	24,49 b	30,86 b	36,54 b
	301 R1	0,36 a	0,22 c	0,25 c	0,24 c	0,0 a	36,20 b	28,36 b	31,45 b
	365 R2	0,37 a	0,28 b	0,28 b	0,23 c	0,0 a	22,82 b	21,44 b	33,90 b
		CV% 9,70				CV% 34,86			
<i>Corynespora cassiicola</i> (T14-3)	3013 R1	0,36 a	0,23 b	0,28 b	0,23 b	0,0 a	23,82 b	19,19 b	33,97 b
	3016 R3	0,36 a	0,27 b	0,25 b	0,24 b	0,0 a	23,63 b	28,22 b	32,40 b
	301 R1	0,36 a	0,26 b	0,25 b	0,25 b	0,0 a	26,85 b	28,50 b	28,50 b
	365 R2	0,37 a	0,29 b	0,29 b	0,26 b	0,0 a	20,06 b	19,67 b	27,19 b
		CV% 10,76				CV% 40,99			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Apesar de não haver na literatura informações sobre o efeito antifúngico das nanopartículas de prata sobre o crescimento micelial de *C. guaranicola*, *Colletotrichum* spp. e *C. cassiicola*, alguns trabalhos têm apresentado resultados satisfatórios sobre o efeito de outras nanopartículas de prata sobre diferentes fungos. De acordo com Rai (2013), as nanopartículas de prata apresentam amplo espectro de ação contra fungos, especialmente do gênero *Candida*, fato confirmado por Carreira et al. (2009) e Segala et al. (2012), os quais, avaliando o efeito de nanopartículas de prata sobre o crescimento de *Candida albicans*, observaram que elas proporcionaram inibição total do crescimento desse fitopatógeno.

Petica et al., (2008) também relataram atividade antifúngica de nanopartículas de prata em espécies de fungos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Kim et al. (2009), avaliando o efeito antifúngico de nanopartículas de prata (CV-WA13; AT-WB13R; PR-WB13) no controle *in vitro* de *Raffaelea* sp., observaram que o crescimento do fungo foi significativamente inibido dependendo da dose aplicada (0; 5; 10 e 25 ppm), de modo que quanto maior a dose menor foi o crescimento de hifas do fungo, sendo observados efeitos prejudiciais das nanopartículas de prata sobre a germinação dos conídios.

Aguilar-Méndez e colaboradores (2011) avaliaram o efeito antifúngico de nanopartículas de prata no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, fungo causador da antracnose em diversos frutos, e observaram a diminuição do crescimento micelial de uma maneira dependente da dose aplicada, a inibição do fungo atingiu quase 90%.

Kim et al., (2012) avaliaram o efeito antifúngico de diferentes concentrações (10; 25; 50 e 100 ppm) de três nanopartículas de prata (WA-CV-WA13B; WA-AT-WB13R; WA-PR-WB13R) no controle *in vitro* de dezoito espécies de fungos fitopatogênicos, observando que a inibição total do crescimento da maioria dos patógenos foi observada na concentração de 100 ppm das nanopartículas, como é o caso de *Fusarium* sp., tendo a nanopartícula de prata WA-CV-WA13B apresentado maior potencial de inibição. Além disso, quando utilizada a concentração de 10 ppm, pode-se observar a menor taxa de inibição, que foi de 12,7% para o fungo *Glomerella cingulata* Stoneman, indicando que a atividade antifúngica dessas nanopartículas de prata depende de sua concentração.

Salienta-se que estes estudos devem ser realizados isoladamente para cada patógeno, de vez que a ação fungicida das nanopartículas de prata, conforme mostrado por diversos pesquisadores (KIM et al., 2009; KIM et al., 2012), está associada à concentração aplicada dessa nanopartícula, bem como ao patógeno analisado.

### **5.5 Atividade antifúngica de nanopartículas de prata na produção de esporos dos fitopatógenos**

Os esporos são unidades reprodutivas e infectivas dos fungos fitopatogênicos responsáveis por produzir propágulos que se disseminam e infectam a planta. Assim, quanto maior a inibição da formação de esporos, mais eficiente é o produto (SIMON et al., 2016), uma vez que a redução da produção e consequente disseminação pode resultar na menor taxa de progresso da doença em campo, sendo este um efeito epidemiologicamente desejável.

Foi observado efeito significativo das soluções reacionais sobre a porcentagem de inibição da esporulação (PIE) de *C. guaranicola* (I02 e I11) e *Colletotrichum* spp. (IRPD-18) (Tabela 7). O isolado *C. cassicola* (T14-3) não teve a PIE avaliada devido não ocorrer esporulação dos inóculos durante toda a avaliação do experimento.

Tabela 7 – Porcentagem de inibição da esporulação (PIE) de fitopatógenos submetidos a diferentes doses de nanopartículas de prata

Fungo Fitopatogênico	Solução reacional	Doses			
		0 $\mu$ L (Test.)	100 $\mu$ L	500 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
<i>Colletotrichum guaranicola</i> (I02)	3013 R1	0,00 a	96,28 d	97,79 e	98,43 e
	3016 R3	0,00 a	95,64 d	97,78 e	98,85 e
	301 R1	0,00 a	82,96 b	86,97 c	97,88 e
	365 R2	0,00 a	97,08 d	98,88 e	99,67 e
CV% 1,19					
<i>Colletotrichum guaranicola</i> (I11)	3013 R1	0,00 a	67,92 d	90,48 e	95,76 f
	3016 R3	0,00 a	53,56 c	71,90 d	89,60 e
	301 R1	0,00 a	80,94 e	92,91 f	99,39 f
	365 R2	0,00 a	39,82 b	73,87 d	98,04 f
CV% 9,25					
<i>Colletotrichum spp.</i> (IRPD-18)	3013 R1	0,00 a	74,74 c	92,59 d	98,04 d
	3016 R3	0,00 a	48,17 b	72,87 c	91,53 d
	301 R1	0,00 a	75,89 c	91,23 d	98,29 d
	365 R2	0,00 a	47,88 b	78,85 c	97,21 d
CV% 10,24					

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

A solução reacional do isolado 365 R2 na dose de 100  $\mu$ L apresentou a menor PIE, correspondendo a 39,82% para o fitopatógeno *C. guaranicola* (I11). As soluções reacionais dos isolados 365 R2 e 301 R1, apresentaram a maior PIE na dose de 1000  $\mu$ L, com valores de 99,67% para o fitopatógeno *C. guaranicola* (I02) (Figura 20) e 99,39% para o fitopatógeno *C. guaranicola* (I11) (Figura 21), respectivamente.

Figura 20 – Esporulação do fitopatógeno *C. guaranicola* (I02). A – Testemunha; B - 1000  $\mu$ L da solução reacional do isolado 365 R2

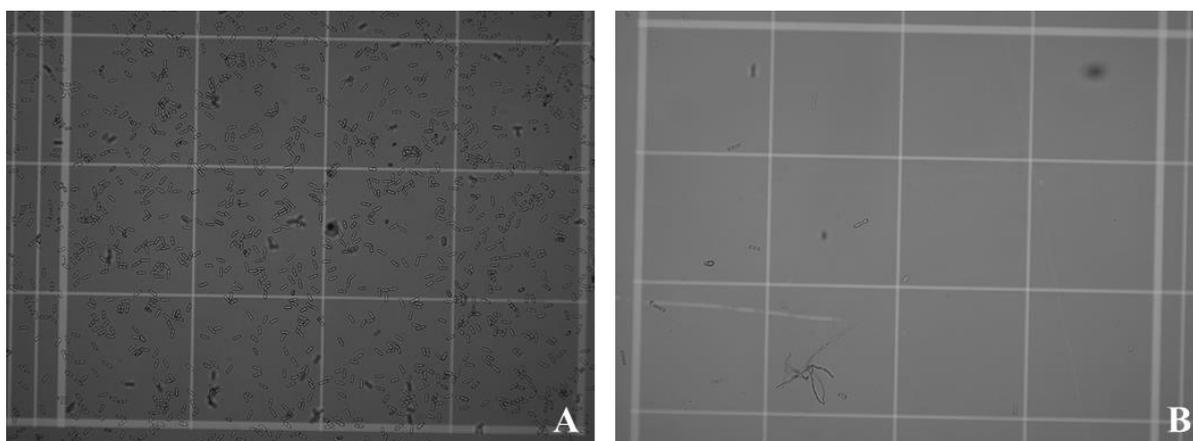
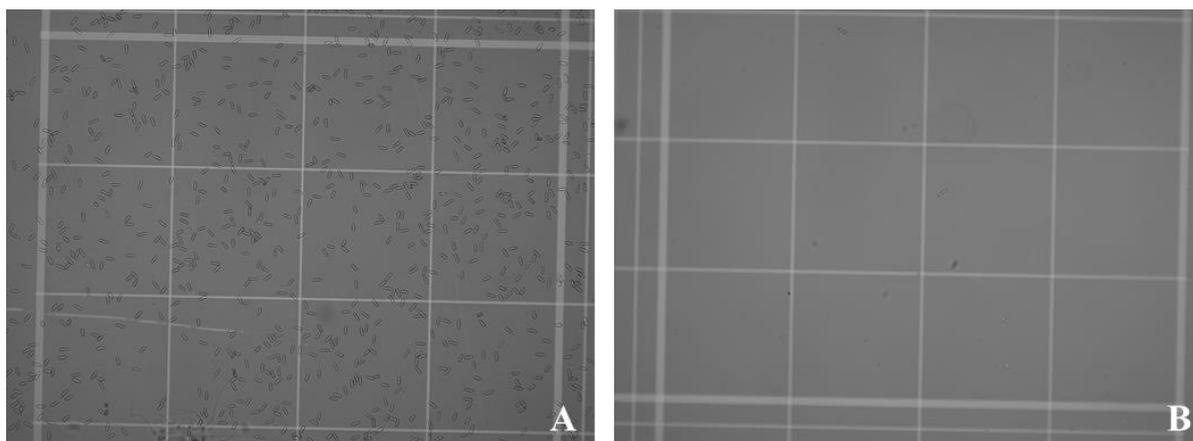


Figura 21 – Esporulação do fitopatógeno *C. guaranica* (I11). A – Testemunha; B - 1000  $\mu$ L da solução reacional do isolado 301 R1



Na dose de 100  $\mu$ L, as soluções reacionais que apresentaram os maiores valores de PIE foram dos isolados 365 R2, representado por 97,08% para o fitopatógeno *C. guaranica* (I02); isolado 301 R1, representado por 80,94% para o fitopatógeno *C. guaranica* (I11), e 75,89% para o fitopatógeno *Colletotrichum* spp. (IRPD-18).

Para a dose de 500  $\mu$ L, as soluções reacionais que apresentaram os maiores valores de PIE foram o isolado 365 R2, representado por 98,88% para o fitopatógeno *C. guaranica* (I02); isolado 301 R1, representado por 92,91% para o fitopatógeno *C. guaranica* (I11), e; isolado 3013 R1, representando 92,59% para o fitopatógeno *Colletotrichum* spp. (IRPD-18).

Por sua vez, a solução reacional do isolado 301 R1, na dose de 1000  $\mu$ L, apresentou depois da solução reacional do isolado 365 R2 os maiores resultados de inibição da esporulação, apresentando 99,39% para o fitopatógeno *C. guaranica* (I02), e 98,29% para o fitopatógeno *Colletotrichum* spp. (IRPD-18).

Para o fitopatógeno *C. guaranica* (I02) a solução reacional do isolado 301 R1 apresentou as menores PIE nas três doses avaliadas, sendo mais efetivo na dose de 1000  $\mu$ L, apresentando 97,88% de inibição.

Para o fitopatógeno *C. guaranica* (I11) e *Colletotrichum* spp. (IRPD-18) a solução reacional do isolado 365 R2 apresentou menor PIE na dose de 100  $\mu$ L (39,82% e 47,88% respectivamente), e o isolado 3016 R3 apresentou menor PIE para as doses de 500 e 1000  $\mu$ L, 71,90% e 89,60% para o *C. guaranica* (I11) e 72,87% e 91,53% para o *Colletotrichum* spp.

## 6 CONCLUSÕES

Os isolados 3013 R1, 3016 R3, 301 R1 e 365 R2 da espécie *Fusarium concolor* apresentam potencial para a produção de nanopartículas de prata, através do método de síntese verde. A produção de nanopartículas varia de acordo com o meio de cultura, temperatura, tempo de reação, pH, concentração de nitrato de prata e etc., que podem vir a ser alterados com o intuito de testar os demais isolados que dentro desta metodologia proposta no trabalho não apresentaram potencial para a síntese de AgNPs.

As análises de UV-Vis apresentaram picos de absorbância que variaram de 400 a 500 nm, que caracteriza a síntese de AgNPs, e a partir da microscopia eletrônica de varredura foi constatado a presença das NPs no meio interno, sendo confirmado pela leitura no EDS, onde foi constatado o sinal de prata nas soluções reacionais indicando a presença deste elemento resultado da incorporação do nitrato de prata ao tratamento feito por 216h de reação.

Estatisticamente, constata-se diferenças significativas na avaliação da atividade antifúngica no controle *in vitro* dos fitopatógenos *Coletotrichum guaranicola*, *Coletotrichum* spp. e *Corynespora cassicola*. Os dados demonstram de forma clara que as nanopartículas de prata produzidas pelas soluções reacionais são capazes de inibir significativamente o crescimento e o desenvolvimento dos fungos fitopatogênicos e de seus esporos, através da realização do teste de crescimento micelial e produção de esporos.

A dependência das doses aplicadas foi constatada para os fitopatógenos *C. guaranicola* (I02 e I11) e *Coletotrichum* spp. (IRPD-18). Para o fitopatógeno *C. cassicola* (T14-3) não houve diferença estatística entre as doses aplicadas. As soluções reacionais dos isolados 3013 R1 e 3016 R3 apresentam maior índice antifúngico para o fungo *C. guaranicola* na dose de 1000 µL.

Os resultados encontrados no presente trabalho sugerem a possibilidade de utilização de nanopartículas de prata biossintetizadas no controle de fitopatógenos, como uma alternativa para colaborar na redução do uso de agroquímicos com elevada toxicidade.

## REFERÊNCIAS

- ABDELGHANY, T.M.; AL-RAJHI, A.M.H.; ABOUD, M.A.A.; ALAWLAQI, M.M.; MAGDAH, A.G.; HELMY, E.A.N.; MABROUK, A.S. Recent Advances in Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications: About Future Directions. A Review. **BioNanoScience**, v. 8, n. 1, p. 5-16, 2018.
- ABDELRAHIM, K.; MAHMOUD, S.Y.; ALI, A.M.; ALMAARY, K.S.; MUSTAFA, A.E.M.A.; HUSSEINY, S.M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Rhizopus stolonifer*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 24, p. 208-216, 2017.
- ABOU EL-NOUR, K.M.; EFTAIHA, A.; AL-WARTHAN, A.; AMMAR, R.A. Synthesis and applications of silver nanoparticles. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 3, p. 135-140, 2010.
- AGUILAR-MÉNDEZ, M.A.; MARTÍN-MARTÍNEZ, E.S.; ORTEGA-ARROYO, L.; COBIÁN-PORTILLO, G.; SÁNCHEZ-ESPÍNDOLA, E. Synthesis and characterization of silver nanoparticles: effect on phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*, **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, p. 2525-2532, 2011.
- AHMAD, A.; MUKHERJEE, P.; SENAPATI, S.; MANDAL, D.; KHAN, M.I.; KUMAR, R.; SASTRY, M. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 28, p. 313-318, 2003.
- AHMAD, T.; WANI, I.A.; MANZOOR, N.; AHMED, J.; ASIRI, A.M. Biosynthesis, structural characterization and antimicrobial activity of gold and silver nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 107, p. 227-234, 2013.
- AHMED, S.; AHMAD, M.; SWAMI, B.L.; IKRAM, S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. **Journal of Advanced Research**, v. 7, p. 17-28, 2016.
- AI, H.; JONES, S.A.; LVOV, Y.M. Biomedical applications of electrostatic layer-by-layer nano-assembly of polymers, enzymes, and nanoparticles. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 39, n.1, p. 23-43, 2003.
- ALGHUTHAYMI, M.A.; ALMOAMMAR, H.; RAI, M.; SAID-GALIEV, E.; ABDEL-SALAM, K.A. Agriculture and Environmental Biotechnology. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 221-236, 2015.
- ALBERNAZ, V.L. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização físicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. 2014. 122f. Dissertação – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2014.
- ALANI, F.; MOO-YOUNG, M.; ANDERSON, W. Biosynthesis of silver nanoparticles by a new strain of *Streptomyces* sp. compared with *Aspergillus fumigatus*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 1081-1086, 2012.

ANDRADE, F.A.C.S.; RIGO, E.C.S.; VERCÍK, L.C.O.; MELO, M.P.; CUNHA, L.T.; MIRANDA, E.T.; FONTANA, C.R. **Inserção de Nanopartículas de Prata em Hidroxiapatita: Efeito Antibacteriano Sobre *Staphylococcus aureus***. Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, Natal-RN, agosto, 2012.

AQILI, A.; QIU, H.; GREISCH, J., JÉRÔME, R.; DE PAUW, E.; JÉRÔME, C. Coating of gold nanoparticles by thermosensitive poly (N-isopropylacrylamide) end-capped by biotin. **Polymer**, v. 49, p. 1145-1153, 2008.

ASHKARRAN, A.A.; IRAJI, A.; MAHDAVI, S.M. Rapid and eficiente synthesis of colloidal gold nanoparticles by arc discharge method. **Applied Physics A**, v. 96, n. 2, p. 423-428, 2009.

ASLAN, K.; HOLLEY, P.; GEDDES, C.D. Metal-enhanced fluorescence from silver nanoparticle-deposited polycarbonate substrates. **Journal of Materials Chemistry**, v. 16, n. 17, p. 2846, 2006.

AZEVEDO, J.L., SERAFINE, L.A., BARROS. N.M. **Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais**. In: L.A. SERAFINE; N.M. BARROS; J.L. AZEVEDO. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Indústria**. Editora Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul. Cap. 08, p. 233-265, 2002.

BAI, P.; LIN, Y.; ZHANG, X.; ZHOU, W.; CHEN, T.; MA, Y.; HOU, T.; BRIDGES, D.; OAKES, K.D.; HU, A. Two-Step photonic reduction of controlled periodic silver nanostructures for surface-enhanced raman spectroscopy. **Plasmonics**, v. 10, n. 6, p. 1127-1136, 2015.

BAKER, S.; SATISH, S.; Endophytes: natural warehouse of bioactive compounds. **Drug Invention Today**, v. 4, n. 11, p. 548-553, 2012a.

BAKER, S.; SATISH, S.; Antimicrobial activity and biosynthesis of nanoparticles by endophytic bacterium inhabiting Coffee arabica L. **Scientific Journal of Biological Sciences**, v. 1, n. 5, p. 107-113, 2012b.

BALASUBRAMANIAN, S. K.; YANG, L.; YUNG, L.L.; ONG, C.; ONG, W.; YU, L.E. Characterization, purification, and stability of gold nanoparticles. **Biomaterials**, v. 31, p. 9023-9030, 2010.

BALLOTTIN, D.P.M. **Caracterização de nanopartículas de prata e sua aplicação na produção de tecido antimicrobianos**. 2014. 235f. Tese – Universidade Estadual de Campinas, Caminas, São Paulo, 2014.

BANSAL, V.; RAUTARAY, D.; AHMAD, A.; SASTRY, M Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. **Journal of Materials Chemistry**, v. 14, p. 3303-3305, 2004.

BARROS, C.H.N. **Síntese e caracterização de nanopartículas de prata: estudo de interações com biomoléculas e atividade antimicrobiana**. 2017. 135f. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2017.

BASTUS, N.G.; MERKOÇI, F.; PIELLA, J.; PUNTES, V. Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: kinetic control and catalytic properties. **Chemistry Materials**, v. 26, p. 2836-2846, 2014.

BAUTISTA-BANÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C.L. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, v. 22, n. 9, p. 1087-1092, 2003.

BIRLA, S.S.; TIWARI, V.V.; GADE, A.K.; INGLE, A.P.; YADAV, A.P.; RAI, M.K. Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Journal compilation. **The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 173-179, 2009.

BORM, P.J.; ROBBINS, D.; HAUBOLD, S.; KUHLEBUSCH, T.; FISSAN, H.; DONALDSON, K.; SCHINS, R.; STONE, V.; KREYLING, W.; LADEMANN, J.; KRUTMANN, J.; WARHEIT, D.; OBERDORSTER, E. The potential risks of nanomaterials: A review carried out for ECETOC. **Particle and Fibre Toxicology**, v.3, 2006.

BOWMAN, S.M.; FREE, J.F. The structure and synthesis of the fungal cell-wall. **BioEssays**, v. 28, p. 799-808, 2011.

BUDHIRAJA, A.; NEPALI, K.; SAPRA, S.; GUPTA, S.; KUMAR, S.; DHAR, K.L. Bioactive metabolites from an endophytic fungus of *Aspergillus* species isolated from seeds of *Gloriosa superba* Linn. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 1, p. 323-329, 2013.

BUZEA, C.; PACHECO, I.I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. MR17-MR71, 2007.

CAGLIARI, I.V. **Clonagem, expressão, purificação e caracterização da proteína SGT1 da cana-de-açúcar, uma co-chaperona do sistema Hsp90**. 2016. 88f. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2016.

CASTRO, M.E.; COTTET, L.; CASTILLO, A. Biosynthesis of gold nanoparticles by extracellular molecules produced by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. **Materials Letters**, v. 115, p. 42-44, 2014.

CAO, R.; LIU, X.; GAO, K.; MENDGEN, K.; KANG, Z.; GAO, J.; DAI, Y.; WANG, X. Mycoparasitism of endophytic fungi isolated from reed on soilborne phytopathogenic fungi and production of cell wall-degrading enzymes in vitro. **Current Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 584-592, 2009.

CARREIRA, C. M.; PEREIRA, C. A.; BOMBANA, A. C.; JORGE, A. O. C. Eficácia antimicrobiana das nanopartículas de prata sobre esporos, leveduras e bactérias. **XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino**

**Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba.** Trabalho apresentado, São José dos Campos, 2009.

CARROLL, G. C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. **Ecology, Brooklym**, v. 69, p. 2-9, 1988.

CHAN, Y.S.; MASHITAH, M.D. Instantaneous biosynthesis of silver nanoparticles by selected macro-fungi. **Australian Journal Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 1 p. 86-88, 2012.

CHAN, Y.S.; MAT DON, M. Biosynthesis and structural characterization of Ag nanoparticles from white rot fungi. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 1, p. 282–288, 2013.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 47-59, 2012.

CHEN, J.C.; LIN, Z.H.; MA, X.X. Evidence of the production of silver nanoparticles via pretreatment of *Phoma* sp.3.2883 with silver nitrate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p.105-108, 2003.

CHOUDHURY, S.R.; NAIR, K.K.; KUMAR, R.; GOGOI, R.; SRIVASTAVA, C.; GOPAL, M.; SUBHRAMANYAM, B.S.; DEVAKUMAR, C.; GOSWAMI, A. Nanosulfur: a potent fungicide against food pathogen, *Aspergillus niger*. **AIP Conference Proceedings**, v. 1276, p. 154-157, 2010.

DANIEL, M.C.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 1, 2004.

DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; PANDIAN, S.R.K.; GURUNATHAN, S. **An insight into the bacterial biogenesis of silver nanoparticles, industrial production and scale-up.** In: RAI, M.; DURÁN, N. (eds) **Metal nanoparticles in microbiology.** Springer-Verlag, Berlin, p. 17–35, 2011.

DERBALAH, A. S.; ELKOT, G. A. E.; HAMZA, A. M. Laboratory evaluation of botanical extracts, microbial culture filtrates and silver nanoparticles against *Botrytis cinerea*. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1331-1337, 2011.

DEVARAJU, R.; SATISH, S. Endophytic fungi: trapped or hidden store houses of bioactive compounds within plants: A Review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, p. 2986-2989, 2010.

DEVI, L.S.; JOSHI, S.R. Ultrastructures of silver nanoparticles biosynthesized using endophytic fungi. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 3, p. 29-37, 2015.

DEVI, T.P.; KULANTHAIVEL, S.; KAMIL, D.; BORAH, J.L.; PRABHAKARAN, N.; SRINIVASA, N. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Trichoderma* species. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, p. 543-547, 2013.

DIAS, M.A. Removal of heavy metals by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in a polyurethane matrix. **Letters Applied Microbiology**, v. 34, p. 46-50, 2002.

DINGLE, J.; MCGEE, P.A. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. tritici in wheat. *Mycological Research*, v. 107, p. 310-316, 2003.

DREXLER, K.E.; SMALLEY, R.E. Chemical and engineering News. **Chemical & Engineering News**, v. 81, p. 37-42, 2003.

DURAN, N.; MARCATO, P.D.; ALVES, O.L.; SOUZA, G.I.H.; ESPOSITO, E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, n. 8, 2005.

DURAN, N.; MATTOSO, L.H.C.; DE MORAIS, P.C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. Ed. Antenna, 208p. 2006.

DURAN, A.; NOMBELA, C. Fungal cell-wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. **Microbiology**, v. 150, p. 3099-3103, 2004.

ELSUPIKHE, R.F.; SHAMELI, K.; AHMAD, M.B.; IBRAHIM, N.A.; ZAINUDIN, N. Green sonochemical synthesis of silver nanoparticles at varying concentrations of  $\kappa$ -carrageenan. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, p. 302, 2015.

EDER, D.; MOTTA, M.; WINDLE, A.H. Iron-doped Pt-TiO<sub>2</sub> nanotubes for photocatalytic water splitting. **Nanotechnology**, v. 20, 2009.

EGUCHI, E.S.; CECATO, U.; SILVA, S.L. O caminho da nanotecnologia na produção animal brasileira. **PUBVET**, Londrina, v. 7, n. 8, Ed. 231, Art. 1528, 2013.

FARADAY, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. **Philosophical Transactions Royal Society of London**, v. 147, p.145-181, 1857.

FELDHEIM, D. L.; FOSS, C. A. **Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications**. 1 Ed. Marcel Dekker. New York, 2002.

FERNANDES, L. C. B.; ALBUQUERQUE, C.C.; JÚNIOR, R.S.; OLIVEIRA, F.F.M.; GURGEL, E.P.; MESQUITA, M.V.; SILVA, M.D.S. Fungitoxicity of plant extracts and essential oil of *Lippia gracilis* Schauer on the fungus *Monosporascus cannonballus* Pollack and Uecker. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 2, p. 153-155, 2015.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotechnology: general aspects and potential applications in catalysis. **Química Nova**, v. 32, n. 7, 2009.

FORTÍ, J. A. **Aspectos patológicos, epidemiológicos y culturales de *Acremonium cucurbitacearum***. 1997. 183f. Tese – Universidad Politécnica de Valencia, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Departamento de Producción Vegetal, Valencia, p. 183, 1997.

FRANCIS, S.; JOSEPH, S.; KOSHY, E.P.; MATHEW, B. Microwave assisted green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of elephantopus scaber and its environmental and biological applications. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, 2017.

FURLANETO, F. P. B. Nanotecnologia no setor agropecuário. *Pesquisa & Tecnologia*, v. 8, n. 2, 2011. Disponível em: <www.aptaregional.sp.gov.br>. Acesso em: 11 jan. 2016.

GADE, A.; GAIKWAD, S.; DURAN, N.; RAI, M. Green synthesis of silver nanoparticles by *Phoma glomerata*. *Micron*, v. 59, p. 52-59, 2014.

GAIKWAD, S.C.; BIRLA, S.S.; INGLE, A.P.; GADE, A.K.; MARCATO, P.D.; RAI, M.; DURAN, N. Screening of different *Fusarium* species to select potential species for the synthesis of silver nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 12, p. 1974-1982, 2013.

GAJBHIYE, M.; KESHARWANI, J.; INGLE, A.; GADE, A. and RAI, M. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 5, p. 382-386, 2009.

GALEMBECK, F.; RIPPEL, M. M. **Parcerias Estratégicas**, n. 18, 2004.

GAO, F.K.; DAI, C.C.; LIU, X.Z. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, v. 4, p. 1346-1351, 2010.

GARCIA, M.V. D. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis**. 2011. 89f. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2011.

GHORBANI, H.R.; SAFEKORDI, A.A.; ATTAR, H.; SORKHABADI, S.M.R. Biological and non-biological methods for silver nanoparticles synthesis. **Chemical Biochemical Engineering Q**, v. 25, p. 317-326, 2011.

GRASSIAN, V.H. When size really matters: size-dependent properties and surface chemistry of metal and metal oxide nanoparticles in gas and liquid phase environments. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 47, p. 18303-18313, 2008.

GOPINATH, V.; MUBARAKALI, D.; PRIYADARSHINI, S.; PRIYADHARSSHINI, N. M.; THAJUDDIN, N.; VELUSAMY, P. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Tribulus terrestris* and its antimicrobial activity: a novel biological approach. **Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces**, v. 96, p. 69-74, 2012.

GOU, Y.; ZHANG, F.; ZHU, X.; LI, X. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Sphingomonas paucimobilis* sp. BDS1. **IET Nanobiotechnology**, v. 9, 53-57, 2015.

GUO, Z.; XING, R.; LIU, S.; ZHONG, Z.; JI, X.; WANG, L.; LI, P. The influence of the cationic of quaternized chitosan on antifungal activity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p. 214-217, 2007.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processos de separação com membranas**. Rio de Janeiro: E-Papers, 2006.

HAMAYUN, M.; KHAN, S.A.; KIM, H.Y.; CHAUDHARY, M.F.; HWANG, Y.H.; SHIN, D.H.; KIM, I.K.; LEE, B.H.; LEE, I.J. Gibberellin production and plant growth enhancement by newly isolated strain of *Scolecobasidium tshawytschae*. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 19, p. 560-565, 2009.

HAMED, S.; SHOJAOSADATI, S.A.; SHOKROLLAHZADEH, S.; HASHEMI-NAJAF, A.S. Controlled Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatant of Filamentous Fungus. **Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 36, n. 5, 2017.

HEMAT, N.K.S.; KUMAR, G.; KARTHIK, L.; BHASKARA, R.K.V. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the filamentous fungus *Penicillium* sp. **Archives of Applied Science Research**, v. 2, p. 161-167, 2010.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; MESQUINI, R.M.; CRUZ, M.E.S.; STANGARLIN, J.R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicas in vitro e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 3, p. 439-445, 2012.

HONARY, S.; HAMED, B.; ESHRAT, G.; FARZANEH, N. Green synthesis of silver nanoparticles induced by the fungus *Penicillium citrinum*. **Trop J Pharma Res**, v. 12, p. 7-11, 2013.

HORIKOSHI, S.; SERPONE, N. Microwaves in Nanoparticle Synthesis. 2013, p.1-24. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527648122>>. Acesso em: 04 jan. 2019.

HUANG, J.L.; LI, Q.B.; SUN, D.H.; LU, Y.H.; SU, Y.B.; YANG, X.; WANG, H.X.; WANG, Y.P.; SHAO, W.Y.; HE, N.; HONG, J.Q.; CHEN, C.X. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. **Nanotechnology**, v. 18, n. 10, p. 1–11, 2007.

HULLA, J.E.; SAHU, S.C.; HAYES, A.W. Nanotechnology: History and future. **Human and Experimental Toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1318-1321, 2015.

HUSAIN, S.; SARDAR, M.; FATMA, T. Screening of cyanobacterial extracts for synthesis of silver nanoparticles. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 1279-1283, 2015.

HUSEN, A.; SIDDIQI, K.S. Phytosynthesis of nanoparticles: concept, controversy and application. **Nano Res Lett**, v. 9, n. 229, 2014.

HUSSEINY, S.M.; SALAH, T.A.; ANTER, H.A. Biosynthesis of size controlled silver nanoparticles by *Fusarium oxysporum*, their antibacterial and antitumor activities. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 4, p. 225-231, 2015.

HYDE, K.D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Divers**, v. 33, p. 163-173, 2008.

INGLE, A.; GADE, A.; PIERRAT, S.; SONNICHSEN, C.; RAI, M. Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria. **Current Nanoscience**, v. 4, p. 141-144, 2008.

INMETRO. Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – CONMETRO. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/resc/pdf/RESC000114.pdf>>. Acesso em: 07 jan. 2019.

IRAVANI, S. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 2638-2650, 2011.

JAIN, N.; BHARGAVA, A.; MAJUMDAR, S.; TARAFDAR, J.C.; PANWAR, J. Extracellular biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Aspergillus flavus* NJP08: A mechanism perspective. **Nanoscale**, v. 3, p. 635-641, 2011.

JO, H.J.; CHOI, J.W.; LEE, S.H.; HONG, S.W. ACUTE toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against *Daphnia magna*: the importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. **Journal Hazardous Materials**, v. 227, p. 301–308, 2012.

KALAIARASI, R.; JAYALLAKSHMI, N.; VENKATACHALAM, P. Phytosynthesis of nanoparticles and its applications. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, v. 11, p. 1-16, 2010.

KAVROULAKIS, N.; NTOUGIAS, S.; ZERVAKIS, G.I.; EHALIOTIS, C.; HARALAMPIDIS, K.; PAPADOPOULOU, K.K. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. **Journal Experimental Botany**, v. 58, p. 3853-3864, 2007.

KHAN, A.L.; HAMAYUN, M.; KANG, S.M.; KIM, Y.H.; JUNG, H.Y.; LEE, J.H.; LEE, I.J. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC Microbiology**, v. 12, p. 1-14, 2012.

KIM, K.J.; SUNG, W.S.; SUH, B.K.; MOON, S.K.; CHOI, J.S.; KIM, J.G.; LEE, D.G. Antifungal activity and mode of action of silver nano-particles on *Candida albicans*. **Biomaterials**, v. 9, n. 22, p. 235-242, 2009.

KIM, S. W.; JUNG, J.H.; LAMSAL, K.; KIM, Y.S.; MIN, J.S.; LEE, Y.S. Antifungal Effects of Silver Nanoparticles (AgNPs) against Various Plant Pathogenic Fungi. **Mycobiology**, v. 40, n. 1, p. 53-58, 2012.

KIRTH, A. V.; RAHUMAN, A. A.; JAYASEELAN, C.; KARTHIK, L.; MARIMUTHU, S.; SANTHOSHKUMAR, T.; VENKATESAN, J.; KIM, S. K.; KUMAR, G.; KUMAR, S. R. S.; RAO, K. V. B. Novel approach to synthesis silver nanoparticles using plant pathogenic fungi, *Puccinia graminis*. **Materials Letters**, v. 81 p. 69-72, 2012.

KITTELSON, D.B. **Recent Measurements of Nanoparticle Emissions from Engines.** Current Research on Diesel Exhaust Particles Japan Association of Aerosol Science and Technology, p. 5, 2001.

KLABUNDE, K.J.; **Nanoscale materials in chemistry.** Wiley Interscience, Estados Unidos, 2001.

KLAUS-JOERGER, T.; JOERGER, R.; OLSSON, E.; GRANQVIST, C. Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials Science. **Trends in Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 15-20, 2001.

KUMAR, A.S.; ABYANED, M.K.; GOSAVI, S.W.; KULKARNI, S.K.; PASRICHA, R.; AHMAD, A.; KHAN, M.I. Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO<sub>3</sub>. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 439-445, 2007.

KUMAR, A.; VEMULA, P.K.; AJAYAN, P.M.; JOHN, G. Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. **Nature Materials**, v. 7, n. 3, p. 236-41, 2008.

KUMARI, A.R.; SOBHA, K. Nanobiotechnology as a prospective approach For safe environmental remediation – A Review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**. v. 4, n. 4, p. 69-95, 2013.

LIMBORÇO, H. Instrumentação – MEV, FIB e MSE. Microscopia CM-UFGM. 2018. Disponível em: < <http://www.microscopia.ufmg.br> >. Acesso em: 01 dez. 2018.

LINK, S.; EL-SAYED, M.A. Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annual Review of Physical Chemistry*, v.54, p. 331-366, 2003.

LOPES, J.R. **Síntese de nanopartículas de prata (NPsAg) em soluções aquosas de fibroína de seda e gelatina.** 2017. 115f. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2017.

LOSS, M.R. **Carbon Nanotube Reinforced Composites.** 1 Ed. CNR Polymer Science and Technology. ELSEVIER. 2014.

MEDDA, S.; HAJRA, A.; DEY, U.; BOSE, P.; MONDAL, N.K. Biosynthesis of silver nanoparticles from Aloe vera leaf extract and antifungal activity against *Rhizopus* sp. and *Aspergillus* sp. **Applied Nanoscience**, v. 5, n. 7, p. 875-880, 2015.

MELO JR., M. A.; SANTOS, L.S.S.; GONÇALVES, M.C.; NOGUEIRA, A.F. Preparação de Nanopartículas de Prata e Ouro: Um Método Simples Para a Introdução da Nanociência em Laboratório de Ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012.

MENG, X. K.; TANG, S.C.; VONGEHR, S. A review on diverse silver nanostructures. **Journal of Materials Science & Technology**, v. 26, n. 6, p. 487-522, 2010.

MONDAL, N.K.; CHOWDHURY, A.; DEY, U.; MUKHOPADHYA, P.; CHATTERJEE, S.; DAS, K.; DATTA, J.K. Green synthesis of silver nanoparticles and

its application for mosquito control. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, n. 1, p. S204-S210, 2014.

MORONES, J.R.; ELECHIGUERRA, J.L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J.B.; RAMÍREZ, J.T.; YACAMAN, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, n. 10, p. 2346-2353, 2005.

NARAYANAN, K.B.; SAKTHIVEL, N. Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 156, n. 1-2, p. 1-13, 2010.

NAVARRO, E.; PICCAPIETRA, F.; WAGNER, B.; MARCONI, F.; KAEGI, R.; ODZAK, N.; SIGG, L.; BEHRA, R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Science & Technology**, v. 42, p. 8959-8964. 2008.

NEWTON, A.C.; GRAVOUIL, C.; FOUNTAINE, J.M. Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops. **Annals of Applied Biology**, v. 157, p. 343-59, 2010.

OLIVEIRA, M. M. **Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: síntese, caracterização e propriedades**. 2005. 174p. Tese – Universidade do Paraná, Curitiba, PR, 2005.

PACIONI, N.L.; BORSARELLI, C.D.; REY, V.; VEGLIA, A.V. **Synthetic routes for the preparation of silver nanoparticles: A Mechanistic Perspective**. In: ALARCON, E. I. et al. (Ed.), **Silver Nanoparticle Applications, Engineering Materials**. Switzerland: Springer International Publishing, p.13-46, 2015.

PARVEEN, S.; MISRA, R.; SAHOO, S.K. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and medicine**, v. 8, n. 2, p. 147-166, 2012.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, A.; FLORES-ACOSTA, M.; RODRÍGUEZ-MIJANGOS, R.; PÉREZ-ALAS, R. Cu halide nanoparticle formation by diffusion of copper in álcali halide crystals. **Revista Mexicana de Física**, v. 52, n. 2, p. 151-154, 2006.

PETICA, A.; GAVRILIU, S.; LUNGU, M.; BURUNTEA, N.; PANZARU, C. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. **Materials Science and Engineering: B**, v. 152, n. 1-3, p. 22-27, 2008.

PETRINI, O. **Ecological and physiological aspects of host-specificity in endophytic fungi**. In S.C. REDLIN, L.M. CARRIS (eds), **Endophytic fungi in Grasses and Woody Plants**. p. 87-100, 1996.

RADIĆ, N.; STRUKELJ, B. Endophytic fungi: the treasure chest of antibacterial substances. **Phytomedicine**, v. 19, p. 1270-84, 2012.

RAI, M. Nanobiotecnologia verde: biossínteses de nanopartículas metálicas e suas aplicações como nanoantimicrobianos. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 44-48, 2013.

RAI, M.; DURAN, N. **Metal nanoparticles in microbiology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.

RAI, M.; INGLE, A. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 94, p. 287-293, 2012.

RAI, M.; YADAV, A. Plants as potential synthesiser of precious metal nanoparticles: progress and prospects. **IET Nanobiotechnology**, v. 7, n. 3, p. 117-124, 2013.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 76-83, 2009.

RALIYA, R.; TARAFDAR, J.C. Biosynthesis and characterization of zinc, magnesium and titanium nanoparticles: an eco-friendly approach. **International Nano Letters**, v. 93, p. 3-10, 2014.

RAMYADEVI, J.; JEYASUBRAMANIAN, K.; MARIKANI, A.; RAJAKUMAR, G.; RAHUMAN, A.A. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. **Mater Letters**, v. 71, p. 114-116, 2012.

RANI, R.; SHARMA, D.; CHATURVEDI, M.; JP, YADAV. Green Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles of Endophytic Fungi *Aspergillus terreus*. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 8, n. 4, 2017.

RAO, V.K.; VENKATA, A. Conductive silver inks and their applications in printed and flexible electronics. **The Royal Society of Chemistry**, v. 5, n. 95, p. 77760-77790, 2015.

RODRIGUES, A.G.; PING, L.Y.; MARCATO, P.D.; ALVES, O.L; SILVA, M.C.; RUIZ, R.C.; MELO, I.S.; TASIC, L.; DE SOUZA, A.O. Biogenic antimicrobial silver nanoparticles produced by fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, n. 2 p. 775-782, 2012.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SULLIVAN, T.J. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. **Annual Review Ecology and Systematics**, v. 29, p. 319-343, 1998.

SAIKKONEN, K.; SAARI, S.; HELANDER, M. Defensive mutualismo between plants and endophytic fungi? **Fungal Diversity**, v. 41, p. 101-113, 2010.

SANGUIÑEDO, P.; FRATILA, R.M.; ESTEVEZ, M.B.; FUENTE, J.M.; GRAZÚ, V.; ALBORÉS, S. Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Fungi and Their Antibacterial Activity. **Nano Biomed Eng**, v. 10, n. 2, p. 165-173, 2018.

SANTANA, S.V. **Nanopartículas de prata e Ag/ZnO nanoestruturado como agentes antimicrobianos obtidos por processo hidrotermal de micro-ondas**. 2012. 86f. Dissertação – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 2012.

SARAVANAN, M.; NANDA, A. Extracellular synthesis of silver bionanoparticles from *Aspergillus clavatus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 77, p. 214-218, 2010.

SAU, T.K.; ROGACH, A.L. Nonspherical noble metal nanoparticles: colloid-chemical synthesis and morphology control. **Advanced Materials**, v. 22, n. 16, p. 1781-1804, 2010.

SCHRÖFEL, A.; KRATOŠOVA, G.; ŠAFARĀIK, I.; ŠAFARĀIKOVA, M.; RAŠKA, I.; SHOR, L.M. Applications of biosynthesized metallic nanoparticles – A Review. **Acta Biomaterialia**, v. 10, p. 4023–4042, 2014.

SEGALA, K.; BIZARRIA, M. T.; SILVA, A. S. F.; MARTINEZ, E. F.; MEI, L. H. I. Estudo comparativo do efeito antimicrobiano de nanopartículas de prata incorporadas em nanofibras eletrofiadas de quitosana/poli-óxido de etileno. **7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB)**, Natal, 2012.

SHALKEVICH, N.; ESCHER, W.; BURGI, T.; MICHEL, B.; SI-AHMED, L. On the Thermal Conductivity of Gold Nanoparticle Colloids. **Langmuir**, v. 2, p. 663–670, 2010.

SHANKAR, S.; AHMAD, A; SASTRY, M. Geranium leaf assisted biosynthesis of silver nanoparticles. **Biotechnology Progress**, v. 19, p. 1627-1631, 2003.

SHARMA, V.K.; YNGARD, R.A.; LIN, Y. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 145, p. 83-96, 2009.

SHIPWAY, A.; WILLNER, I. Nanoparticles as structural and functional units in surface-confined architectures. **Chem. Commun**, v. 20, p. 2035-2045, 2001.

SIDDIQI, K.S.; HUSEN, A. Engineered Gold Nanoparticles and Plant Adaptation Potential. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 400, 2016.

SIDDIQI, K.S.; HUSEN, A.; RAO, R.A.K. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. **Journal of Nanobiotechnology**. v. 16, n. 14, 2018.

SILVA, H.F.O. **Nanopartículas de prata conjugadas com hidrato de doxiciclina: síntese, caracterização e avaliação da atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli***. 2015. 77f. Dissertação – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2015a.

SILVA, I.O. **Síntese e imobilização de nanopartículas de ouro em fibras regeneradas via exaustão para potencial aplicação biomédica**. 2015. 79f. Dissertação – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2015b.

SIMON, J. M.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; JARDINETTI, V.A.; OLIVA, L.S.C.; SILVA, J.B.; SCARABELI, I.G.R. Atividade fungitóxica de extratos vegetais e produtos comerciais contra *Diplocarpon rosae*. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 4, p. 351-356, 2016.

SINGH, A.K.; RATHOD, V.; SINGH, D.; NINGANAGOUDA, S.; HIREMATH, J.; SINGH, A.K.; MATHEW, J. Optimization and Characterization of Silver Nanoparticle by Endophytic Fungi *Penicillium* sp. Isolated from *Curcuma longa* (Turmeric) and Application Studies against MDR E. coli and S. aureus. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

SINGH, A.K.; RATHOD, V.; SINGH, D.; NINGANAGOUDA, S.; KULKARNI, P.; MATHEW, J.; HAQ, M. Bioactive Silver Nanoparticles from Endophytic Fungus *Fusarium* sp. Isolated from an Ethanomedicinal Plant *Withania somnifera* (Ashwagandha) and its Antibacterial Activity. **International Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 15-19, 2015a.

SINGH, R.; SHEDBALKAR, U.U.; WADHWANI, S.A.; CHOPADE, B.A. Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 99, n. 1, p. 4579-4593, 2015b.

SONI N.; PRAKASH S. Synthesis of gold nanoparticles by the fungus *Aspergillus niger* and its efficacy against mosquito larvae. **Reports in Parasitology**, v. 2, p. 1-7, 2012.

STONE, J.K. Fine structure of latent infections by *Rhabdoclineparkeri* on Douglasfir, with observations on uninfected epidermal cells. **Canadian Journal of Botany**, p. 45-54, 1988.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 257-268, 2004.

SUDARENKOV, V. **Nanotechnology: balancing benefits and risks to public health and the environment**. Committee on Social Affairs, Health and Sustainable Development, 2013.

SUKIRTHA, R.; PRIYANKA, K.M.; ANTONY, J.J.; KAMALAKKANNAN, S.; THANGAM, R.; GUNASEKARAN, P.; KRISHNAN, M.; ACHIRAMAN, S. Cytotoxic effect of green synthesized silver nanoparticles using *Melia azedarach* against in vitro HeLa cell lines and lymphoma mice model. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 273-279, 2012.

SUNKAR, S.; NACHIYAR, V. Endophytes as potential nanofactories. **International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences**, v. 1, p. 488-491, 2013.

THAKKAR, K. N.; MHATRE, S.S.; PARIKH, R.Y. Biological synthesis of metallic nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and medicine**, v. 6, n. 2, p. 257-262, 2010.

TAN, S.; EROL, M.; ATTYGALLE, A.; DU, H.; SUKHISHVILI, S. Synthesis of positively charged silver nanoparticles via photoreduction of  $\text{AgNO}_3$  in branched polyethyleneimine/HEPES solutions. **Langmuir**, v. 23, n. 19, p. 9836-9843, 2007.

TANSIL, N.C.; GAO, Z. Nanoparticles in biomolecular detection. **Nano Today**, v. 1, n. 1, p. 28-37, 2006.

TAVAKOLI, F.; SALAVATI-NIASARI, M.; GHANBARI, D. Application of glucose as a green capping agent and reductant to fabricate CuI micro/nanostructures. **Materials Research Bulletin**, v. 49, n. 1, p. 14-20, 2014.

TEXEIRA, R.R. **Crescimento de nanopartículas de prata em substrato de sílica para futura aplicação em sensores ópticos**. 2014. 71f. Monografia – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2014.

TOMA, H. E. **O mundo nanométrico: a dimensão do novo século**. Ed. Oficina de Textos: São Paulo, 2004.

TROP, M.; NOVAK, M.; RODL, S.; HELLBOM, B.; KROELL, W.; GOESSLER, W. Silver-coated dressing acticoat caused raised liver enzymes and argyria-like symptoms in burn patient. **The Journal of Trauma Injury, Infection, and Critical Care**, v. 60, p. 648-652, 2006.

VALA, A.K.; SHAH, S.; PATEL, R. Biogenesis of silver nanoparticles by marine derived fungus *Aspergillus flavus* from Bhavnagar coast, gulf of Khambat, India. **Journal of Marine Biology & Oceanography**, v. 3, n. 1, p. 1-3, 2014.

VALVERDE-ALVA, M.A.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, T.; VILLAGRÁN-MUNIZ, M.; SÁNCHEZ-AKÉ, C.; CASTAÑEDA-GUSMÁN, R.; ESPARZA-ALEGRÍA, E.; SÁNCHEZ-VALDÉS, C.F.; LLAMAZARES, J.L.S.; HERRERA, C.E.M. Synthesis of silver nanoparticles by laser ablation in ethanol: A pulsed photoacoustic study. **Applied Surface Science**, v. 355, p. 341-349, 2015.

VAHABI, K.; MANSOORI, G.; KARIMI, V. Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma reesei*. **Insciences Journal**, v. 1, n. 1, p. 65–79, 2011.

VEERASAMY, R.; XIN, T.Z.; GUNASAGARAN, S.; XIANG, T.F.W.; YANG, E.F.C.; JEYAKUMAR, N.; DHANARAJ, S.A. Biosynthesis of silver nanoparticles using mangosteen leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 113-120, 2011.

VERANO-BRAGA, T.; MIETHLING-GRAFF, R.; WOJDYLA, K.; ROGOWSKA-WRZESINSKA, A.; BREWER, JR.; ERDMANN, H.; KJELDSEN, F. Insights into the cellular response triggered by silver nanoparticles using quantitative proteomics. **ACS Nano**, v. 8, n. 3, p. 2161-2175, 2014.

VERMA, S.; GOKHALE, R.; BURGESS, D.J. A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of nanosuspensions of glipizide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 380, p. 216-222, 2009.

VICINI, G. **Otimização da produção de esporos do fungo *Clonostachys rosea* – um biopesticida para a cultura do morangueiro**. 2004. 132f. Dissertação – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2004.

VIGNESHWARAN, N.; KATHE, A.A.; VARADARANJAN, P.V.; NACHANE, R.P.; BALASUBRAMANYA, R.H. Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *Phaenerochaete chrysosporium*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 53, p.55-59, 2006.

VIJAYARAGHAVAN, K.; NALINI, S.P.K. Biotemplates in the green synthesis of silver nanoparticles. **Biotechnology Journal**, v. 5, n. 10, p. 1098–1110, 2010.

VITTAL, R.R.; ASWATHANARAYAN, J.B. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. 2011. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/267767207\\_Nanoparticles\\_and\\_their\\_potential\\_application\\_as\\_antimicrobials](https://www.researchgate.net/publication/267767207_Nanoparticles_and_their_potential_application_as_antimicrobials)>. Acesso em: 29 jun. 2016.

VON, B.; RAI, M.; DURÁN, N. Na Insight into the Bacterial Biogenesis of Silver Nanoparticles, Industrial Production and Scale-up. In: **Metal Nanoparticles in Microbiology**. [s.l.] Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 17-35, 2011

WACULICZ-ANDRADE, C.E. **Variabilidade genética de fungos do gênero *Colletotrichum gloeosporioides* de plantas cítricas e da vegetação espontânea**. 2009. 79f. Dissertação – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2009.

WULANDARI, P.; LI, X.; TAMADA, K.; HARA, M. Conformational study of citrates adsorbed on gold nanoparticles using fourier transform infrared spectroscopy. **J Nonlinear Opt Phys Mater**, v. 17, p. 185-192, 2008.

YADAV, A.; KON, K.; KRATOSOVA, G.; DURÁN, N.; INGLE, A.P.; RAI, M. Fungi as an efficient mycosystem for the synthesis of metal nanoparticles: progress and key aspects of research. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 11, p. 2099-2120, 2015.

YANG, N.; AOKI, K. Voltammetry of the silver alkylcarboxylate nanoparticles in suspension. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 25-26, p. 4868-4872, 2005.

YANG, X.; LI, Q.; WANG, H.; HUANG, J.; LIN, L.; WANG, W.; SUN, D.; SU, Y.; BERYA, J.O.; HONG, L.; WANG, Y.; HE, N.; JIA, L. Green synthesis of palladium nanoparticles using broth of *Cinnamom camphora* leaf. **Journal Nanoparticle Research**, v. 12, n.5, 1589–1598, 2010.

YAO, Y.; LENHOFF, A.M. Determination of pore size distributions of porous chromatographic adsorbents by inverse size-exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1037, p. 273-282, 2004.

YEHIA, R.S.; AL-SHEIKH, H. Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles produced by *Pleurotus ostreatus* and their anticandidal and anticancer activities. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 2797-2803, 2014.

YOU, Y.H.; YOON, H.; KANG, S.M.; SHIN, J.H.; CHOO, Y.S.; LEE, I.J.; KIM, J.G. Fungal Diversity and Plant Growth Promotion of Endophytic Fungi from Six Halophytes in Suncheon Bay. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 22, p. 1549-1556, 2012.

ZHANG, D.X.; NAGABHYRU, P.; SCHARDL, C.L. Regulation of a chemical defense against herbivory produced by symbiotic fungi in grass plants. **Plant Physiology**, v. 150, p. 1072-1082, 2009.

ZHANG, X.; LIU, Z.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1534, 2016.

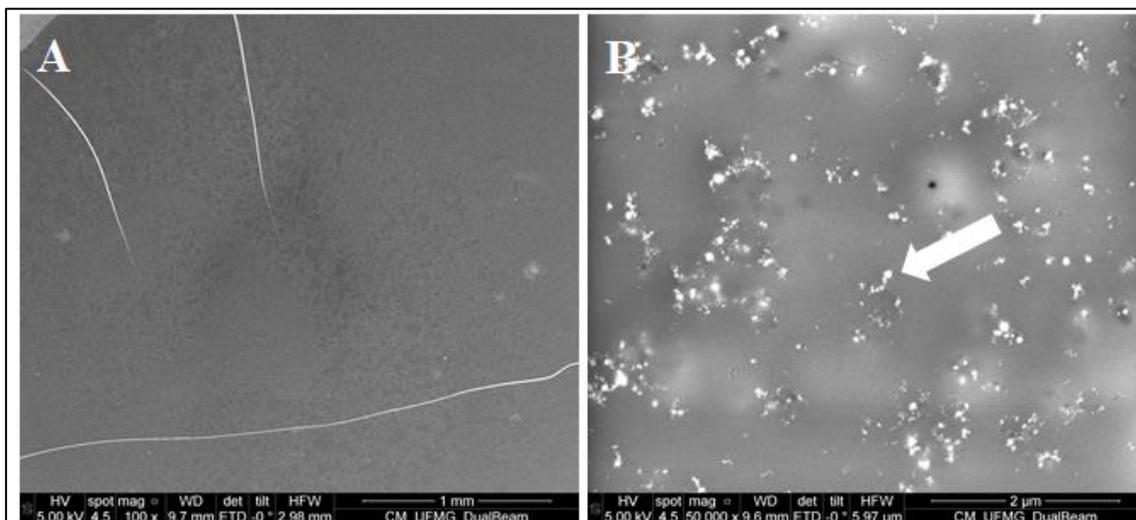
ZHANG, Z.; ROSS, R. D.; ROEDER, R. K. Preparation of functionalized gold nanoparticles as a targeted X-ray contrast agent for damaged bone tissue. **Nanoscale**, v. 2, p. 582-586, 2010.

ZHAO, X.; ZHOU, L.; RAJOKA, M.S.R.; YAN, L.; JIANG, C.; SHAO, D.; ZHU, J.; SHI, J.; HUANG, Q.; YANG, H.; JIN, M. Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. **Critical Reviews In Biotechnology**, 2017.

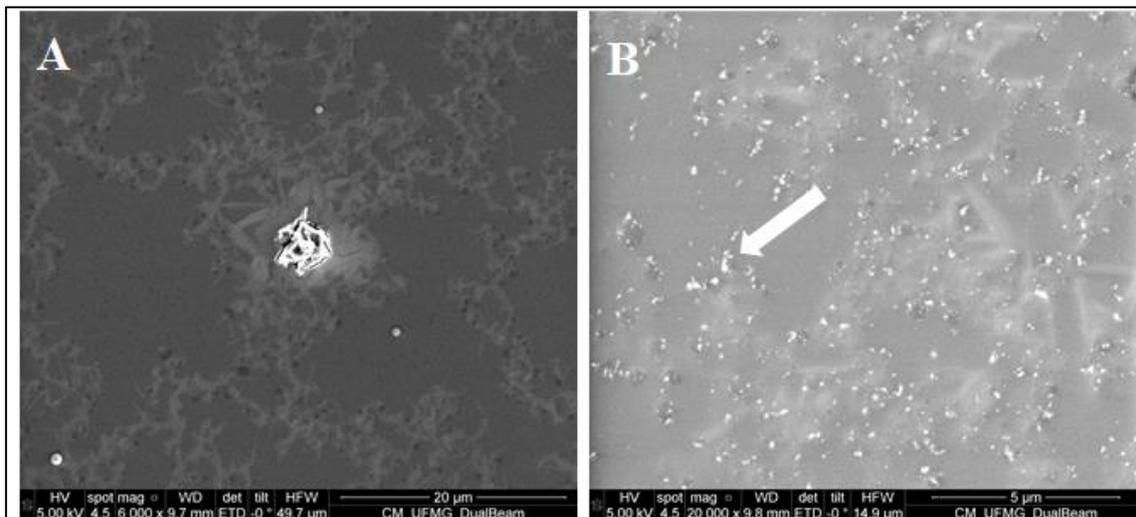
ZUÑIGA, A.D.G.; PEREIRA, J.A.M.; COIMBRA, J.S.R.; MINIM, L.A.; ROJAS, E.E.G. Revisão: Técnicas usadas no processo de purificação de Biomoléculas, **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 61-82, 2003.

## ANEXOS

Anexo 1 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do isolado fúngico 3013 R1. A = Solução reacional controle, B = Solução reacional com AgNPs. Seta branca indica nanopartícula de prata



Anexo 2 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do isolado fúngico 3016 R3. A = Solução reacional controle, B = Solução reacional com AgNPs. Seta branca indica nanopartícula de prata



Anexo 3 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura do isolado fúngico 365 R2. A = Solução reacional controle, B = Solução reacional com AgNPs. Seta branca indica nanopartícula de prata

